Bacillus acidoterrestris sp. nov.
und
Bacillus cycloheptanicus sp. nov.,

zwei neue acidophile Bacillus-Arten,
die ω-alicyclische Fettsäuren enthalten

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Gabriele Deinhard
aus Gelsenkirchen

1987

UNIV.
LIBRARY
KIEL

Bacillus acidoterrestris sp. nov.
und
Bacillus cycloheptanicus sp. nov.,

zwei neue acidophile Bacillus-Arten,
die ω-alicyclische Fettsäuren enthalten

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Gabriele Deinhard
aus Gelsenkirchen

1987

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Oktober 1987

Dekan: Prof. Dr. D. Varjú
1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Poralla
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Loeffler

Diese Arbeit wurde am Institut für Biologie II, Mikrobiologie I (Prof. Dr. H. Zähner) der Universität Tübingen bei Herrn Prof. Dr. K. Poralla angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. K. Poralla für das Überlassen des Themas, die ständige Unterstützung meiner Arbeit, Anregungen und Diskussionen.

Herrn Prof. P. Blanz (jetzt: Universität Bayreuth) danke ich für die Einführung in die APT-Filterhybridisierungsmethode. Ihm und seinen Mitarbeitern, sowie Dr. A. Brennicke (Universität Tübingen, Spezielle Botanik) und seinen Mitarbeitern danke ich für freundliche Aufnahme in ihr Labor.

Herrn Dipl.-Ing. W. Hellrung danke ich für das Schreiben des Num.-Tax.-Programms und seine Hilfe, Anregungen und Diskussionen in Bezug auf alle Computer und Programm betreffenden Fragen.

Ich danke Herrn Dr. H.-P. Fiedler (Universität Tübingen, Mikrobiologie I) für freundliche Unterstützung an der HPLC.

Herrn Dr. R.M. Kroppenstedt (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Arbeitsgruppe Darmstadt) danke ich für das Überlassen von Menachinon-standards.

Herrn Prof. Dr. D. Claus (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen) danke ich für wertvolle Hinweise zu meiner Arbeit.

Dem Lehrbereich Genetik, Institut für Biologie II der Universität Tübingen, danke ich für das Ausleihen des Gilford Spektralphotometers.

Allen Arbeitskolleginnen und -kollegen, ganz besonders Herrn Thomas Härtner, möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und Diskussionsbereitschaft herzlich danken.

Ich danke meinen Freundinnen und Freunden

Heide,

Beate,

Jörg,

Hanne

und besonders

Winfried

und meinen Schwestern

Martina und Katharina

für ihre freundschaftliche Anteilnahme, Aufmunterung und Hilfe, die sie mir während meiner Arbeit geschenkt haben.

Meinem Onkel Friedel danke ich für alles, was er für mich getan hat.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0061

Meinen Eltern

What's in a name? that which we call a rose,
by any other name would smell as sweet.

W. Shakespeare
(Romeo and Juliet, Act II, Scene 2)

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

1. **EINLEITUNG**.....1

2. **MATERIAL UND METHODEN**.....9

2.1. **CHEMIKALIEN**.....9

2.2. **ORGANISMEN**.....9

2.3. **MEDIEN**.....9

2.3.1. Flüssigmedien.....9

2.3.2. Agar-Medien aus B. acidocaldarius-Medium (BAM), B. cycloheptanicus-Medium (SM) und B. coagulans-Medium...12

2.3.3. Agar-Medien für die mesophilen Stämme.....12

2.4. **ANZUCHTBEDINGUNGEN**.....12

2.4.1. Inkubationstemperaturen der Stämme.....12

2.4.2. Anzucht auf Agar-Platten.....13

2.4.3. Flüssigkulturen.....13

2.5. **ERNTE DER ZELLEN**.....13

UNIV. LEIPZIG

Seite

2.6. AUFBEWAHRUNG DER STÄMME....14

2.7. DIE ANWENDUNG DES API 50 CH TESTSYSTEMS....14

2.7.1. Vorversuche zur Medienherstellung....15
2.7.1.1. Salze und Hefeextrakt....15
2.7.1.2. Auswahl des Indikators....16
2.7.2. Beimpfen und Inkubation....16
2.7.3. Ablesen der Testergebnisse....17

2.8. NUMERISCHE TAXONOMIE....18

2.8.1. Beschreibung des Num.-Tax. Computerprogramms....18
2.8.2. Codierung der Ergebnisse des API CH 50 Tests....18
2.8.3. Der Ähnlichkeitskoeffizient....20
2.8.4. Das Average-Linkage Clusteranalyse Verfahren....20

2.9 MENACHINONE....20

2.9.1. Extraktion der Menachinone....20
2.9.2. Herstellung der $AgNO_3$-DC-Platten....21
2.9.3. Trennmethoden....21
2.9.3.1. Dünnschichtchromatographie....21
2.9.3.2. RP18-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)....22
2.9.4. Analytik der Menachinone....22
2.9.4.1. Aufnahme der UV-Spektren von Menachinonmischungen....22
2.9.4.2. Identifizierung der Menachinonhomologen....22

2.10 DNA: G+C GEHALT UND HYBRIDISIERUNG....23

2.10.1. DNA-Extraktion....23

Seite

2.10.2. Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der DNA....24
2.10.3. Bestimmung der DNA-Konzentration mit der Diphenylamin-Methode....25
2.10.4. Bestimmung des G+C Gehalts der DNA mittels Schmelzpunktbestimmung....25
2.10.5. Radioaktive Markierung der DNA mittels Nicktranslation....26
2.10.5.1. Tritium-Markierung der DNA....26
2.10.5.2. ^{32}P-Markierung....27
2.10.6. DNA/DNA Hybridisierung....28
2.10.6.1. DNA/DNA Hybridisierung auf Aminophenylthioether-Papier....28
2.10.6.2. DNA/DNA Hybridisierung mittels Nitrocellulose-Filtersystem....29

3. **ERGEBNISSE**....31

3.1. **VERWERTUNG VON KOHLENSTOFFQUELLEN**....31

3.1.1. Die Vorversuche zur Medienherstellung....31
3.1.2. Beobachtungen zum zeitlichen Verlauf der Säurebildung....32
3.1.3. Die drei Gruppen von Stämmen im API-CH50-Test....34
3.1.3.1. B. acidocaldarius....34
3.1.3.2. Die w-C.hex. Fs haltigen Isolate....36
3.1.3.3. Die w-C.hept. Fs haltigen Isolate....37

3.2. **NUMERISCH TAXONOMISCHE AUSWERTUNG DER KOHLENSTOFFQUELLEN-VERWERTUNG**....39

3.2.1. Clusteranalyse aller Organismengruppen....39
3.2.2. Clusteranalyse der Isolategruppen....45

Seite

3.2.3. Vergleich der thermoacidophilen Gruppen mit bereits bekannten Bacillus-Arten.....48

3.3. ERGEBNISSE DER MENACHINONANALYSEN.....50

3.3.1. Präparative Dünnschichtchromatographie der Menachinonextrakte.....50
3.3.2. UV-Spektren der auf der präparativen Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Substanzen...52
3.3.3. Dünnschichtchromatographische Analyse der Menachinone.55
3.3.4. HPLC der Menachinonextrakte.....58

3.4. DNA: BESTIMMUNG DES G+C GEHALTS.....61

3.4.1. Die DNA-Extraktion.....61
3.4.2. Nachweis der Reinheit der DNA-Proben und Konzentrationsbestimmung.....61
3.4.3. Der G+C Gehalt der DNA der Stämme.....62

3.5. DNA/DNA HYBRIDISIERUNG.....65

3.5.1. Die radioaktive Markierung der DNA.....66
3.5.2. DNA/DNA Hybridisierung auf Filtern.....66
3.5.3. Ergebnisse der DNA/DNA Hybridisierungen.....68

4. DISKUSSION.....71

4.1. Zielsetzung der Arbeit.....71
4.2. Zusammenstellung der bereits bekannten Eigenschaften der untersuchten Stämme.....71
4.2.1. Die w-C.hex. Fs haltigen Isolate.....71
4.2.2. Die w-C.hept. Fs haltigen Stämme.....73

Seite

4.3. Wann gehören zwei Bakterienstämme zu einer Art?.....74
4.4. Die C-Quellen Verwertung:
API-CH5O-System und Numerische Taxonomie.....75
4.5. Die Menachinone.....77
4.6. Der G+C Gehalt der DNA.....78
4.7. Die DNA/DNA Hybridisierungen.....79
4.8. Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen.....80
4.9. Thermophilie: Ist eine Definition möglich?.....80
4.10. Einordnung der untersuchten Arten in
die Gattung Bacillus.....81
4.11. Phylogenetische Aspekte.....84
4.12. Artbeschreibung der neuen Bacillus Species.....86

5. **ZUSAMMENFASSUNG**.....91

6. **LITERATUR**.....93

ABKÜRZUNGEN

Ag-SG DC	DC auf mit Silber (Ag) beschichteten Kieselgel (silica gel) Platten
ATCC	American Type Culture Collection
B.	Bacillus
B. a.	Bacillus acidocaldarius
B. at.	Bacillus acidoterrestris
B. co.	Bacillus coagulans
B. cy.	Bacillus cycloheptanicus
BSA	Bovine serum albumine, Rinderserumalbumin
DC	Dünnschichtchromatographie
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
G+C Gehalt	Guanin plus Cytosin Gehalt
h	Stunde
HPDC (HPTLC)	Hochauflösende Dünnschichtchromatographie (High performance thinlayer chromatographie)
HPLC	High pressure liquid chromatography (=Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
LSC	Flüssigkeitsszintillationszähler (Liquid scintillation counter)
min	Minute
MK-n	Menachinon mit einer n Isoprenylreste umfassenden Seitenkette
MK-n(H2)	Menachinon mit einer n Isoprenylreste umfassenden Seitenkette, bei der 1 Doppelbindung gesättigt vorliegt.
OD	Optische Dichte
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute
w/v	Gewicht pro Volumen
w-C.hex. Fs	ω -Cyclohexan Fettsäure(n)
w-C.hept. Fs	ω -Cycloheptan Fettsäure(n)
v/v	Volumen pro Volumen

1. EINLEITUNG

Schon seit langer Zeit ist die anthropozentrische Denkweise, daß das Leben sich bei 37 °C und neutralem pH mit Sauerstoffatmung abspielt, durch die Entdeckung verschiedenster Organismen, für die diese Bedingungen nicht nur unangenehm, sondern lebensfeindlich sind, ad absurdum geführt worden.
Bei höheren Tieren zeigen sich Anpassungen an diverse Habitate am augenfälligsten auf der morphologischen Ebene, als Beispiele seien der Elefant mit seinen zur Kühlung dienenden Fächerohren, der Eisbär mit seinem dicken Pelz und die Wale mit ihren zu Flossen umgebildeten Extremitäten genannt. Anders die großen Reiche der Eubakterien und Archaebakterien (WOESE und FOX, 1977). Durch die Einzelligkeit dieser Organismen sind die Möglichkeiten zu morphologischen Anpassungen beschränkt, doch bieten sie Beispiele mannigfaltigster Anpassungen auf molekularer Ebene. Man könnte fast sagen, es ist kein Habitat vorstellbar, welches nicht von einem ihrer Vertreter besiedelt werden könnte.

Eine der schon sehr früh beschriebenen Gattungen in der Bakterientaxonomie ist die Gattung Bacillus COHN 1872 (CLAUS und BERKELEY, 1986) in der Familie der Bacillaceae. Die Hauptmerkmale der Gattung sind definiert als gram-positiv, aerob, endosporenbildend und stäbchenförmig. Dazu gehören auch gram-variable oder gram-negative. Diese Charakteristika haben sich im großen und ganzen seit der Erstbeschreibung der Gattung nicht stark verändert.
Die Kombination aus dem morphologischen Merkmal 'Endosporenbildung' und dem physiologischen Merkmal 'aerobes Wachstum' ist im Vergleich zu anderen Bakterien derart herausragend, daß es in der taxonomischen Forschung an Bacillus zur inflationären Beschreibung neuer Arten kam. (GORDON, 1981). Einen Höchststand an Beschreibungen enthält 'Bergey's Manual' in der 5. Ausgabe von 1939 mit 146 Arten. Die Zeit der 'splitter' ging mit den ausführlichen Arbeiten zur Bacillus Taxonomie von SMITH et al. (1946) zu Ende. Diese führten nämlich Standardmethoden in die Taxonomie ein. In den darauffolgenden Ausgaben von 'Bergey's Manual' erschienen nur noch 33 (6. Ausg., 1948) und 22 (7. Ausg. 1957) Arten (Ausgaben 5 bis 7 von Bergey's Manual zitiert nach GORDON,

1981). Damit war die Unübersichtlichkeit der Gattung ersteinmal beseitigt. Doch schon in der nächsten Auflage von 'Bergey's Manual' (GIBSON und GORDON, 1974) gab es zu den 22 Arten weitere 26 Bacillus sp. incertae sedis. In der neuesten Ausgabe sind 40 Arten und 24 sp. incertae sedis enthalten (CLAUS und BERKELEY, 1986). Wie kommt es nun zu einer 'Vermehrung' der Arten? Es sind ja nicht nur völlig neu gefundene darunter, sondern auch Arten, die schon lange beschrieben worden sind, aber entweder durch die geringe Anzahl von Stämmen oder durch nicht genügende physiologische Beschreibungen zu den 'unsicher plazierten Arten' gehören. Ungenügende physiologische Beschreibungen kommen meist dadurch zustande, daß die in der Bacillus-Taxonomie anzuwendenden Standardtests nicht mit diesen Stämmen durchgeführt worden sind. Was aber ist 'Standard'?

SMITH et al. (1946) benutzen für ihre taxonomischen Bestimmungen noch Medien, die aus nicht definierten Bestandteilen hergestellt wurden, wie z.B. Tomaten und Kartoffeln. GORDON et al. (1973) beschrieben die Bacillus Arten aufgrund von 35 morphologischen und physiologischen Eigenschaften, die sie bei auf weitgehend definierten Medien gewachsenen Organismen festgestellt hatten. Konnten diese wenigen Eigenschaften zur Differenzierung der gesamten Gattung Bacillus genügen?

Die Gattung Bacillus ist durch ihre physiologische Formenvielfalt äußerst heterogen. Einige Beispiele sollen dies belegen. B. subtilis, die Typ-Art der Gattung, und einige eng verwandte Arten sind Antibiotikaproduzenten. Es gibt Krankheitserreger wie Bacillus anthracis COHN 1872*, der bei Mensch und Tier zu Milzbranderkrankungen führt, den genetisch ähnlichen B. thuringiensis, der Lepidopteren befällt, B. larvae WHITE 1906*, der aus Honigbienen isoliert wurde.

B. fastidiosus ist ein C-Quellenverwertungsspezialist. Er kann nur Harnsäure, Allantoin und Allantoinsäure nutzen.

Die bisher genannten Arten haben gemeinsam, daß sie hauptsächlich bei Temperaturen von etwa 20 bis 40 °C wachsen. Der Temperaturbereich der Bacillus Habitate reicht aber von 0 °C, wo die psychrophilen Arten B. globisporus STOKES und LARKIN 1967* und B. macquariensis MARSHALL und OHYE 1966* wachsen und sporulieren können, bis 80 °C, wo 'B. caldolyticus' (HEINEN und HEINEN, 1972) und 'B. caldovelox' (HEINEN und HEINEN, 1972) wachsen können.

Während die psychrophilen Arten der Gattung erst relativ spät entdeckt wurden, waren thermophile Bacillus-Arten schon früh bekannt. B. stea-

* alle zitiert nach CLAUS und BERKELEY (1986)

rothermophilus, der bis zu Temperaturen von 75 °C wachsen kann, wurde schon 1920 von DONK* beschrieben, der vermutlich erste Vertreter dieser Art, der bei 73 °C wuchs, schon 1888 aus der Seine isoliert (MIQUEL, zitiert nach WOLF und SHARP, 1981). Ein weiterer Vertreter der 'thermophilen' Bacilli ist B. coagulans HAMMER 1915*. B. coagulans wächst bei Temperaturen zwischen 15 und 60 °C. Nach der Definition der Thermophilie von CAMERON und ESTY (1926) gehört B. coagulans damit zu den fakultativ thermophilen Bacilli, denn er kann bei Temperaturen unter 37 °C wachsen. Eine zweite physiologische Besonderheit bei ihm ist, daß er bei pH Werten, die unter 7 liegen, besser wächst als bei neutralem pH. Der minimale pH-Wert, bei dem B. coagulans noch wachsen kann, liegt zwischen pH 4 und 5. Damit war er der erste acidophile Vertreter der Gattung.

Die andere Seite des pH Spektrums wird von B. alcalophilus besetzt, der bei pH Werten im alkalischen Bereich optimal wächst. Es gibt einige weitere eher alcalophile Bacillus-Arten. Thermophile waren bei den alcalophilen bis zur kürzlichen Beschreibung von B. pallidus (SCHOLZ et al., 1987) nicht bekannt.

Scheinen die Wachstumsbedürfnisse der beiden thermophilen Arten B. coagulans und B. stearothermophilus auf den ersten Blick auch außergewöhnlich, waren sie in der Frühzeit der Konservenindustrie doch schnell bekannte Verderbserreger. Durch die Hitzeresistenz der Sporen konnten die Organismen in den Dosen überleben, und führten zum 'flat-sour' Verderben der Waren. Sie produzieren nämlich kein Gas, weswegen verdorbene Konserven erst beim Gebrauch erkannt werden konnten (BECKER und PEDERSON, 1950, GILLESPIE und THORPE, 1968, FIELDS, 1970).

Während die bis jetzt vorgestellten B.-Arten entweder obligat aerob oder fakultativ anaerob durch Gärung die Energie für ihr Wachstum gewinnen können, findet man mit B. licheniformis und B. azotoformans auch Denitrifikanten.

Mit B. schlegelii wurde zum ersten Mal ein fakultativ chemolithoautotropher, wasserstoffoxidierender Bacillus beschrieben (SCHENK und ARAGNO, 1979). Es handelt sich um ein thermophiles, neutrophiles Bakterium. 1984 wurde ein weiterer, diesmal thermoacidophiler fakultativ chemolithoautotropher Bacillus B. tusciae (BONJOUR und ARAGNO, 1984) beschrieben.

B. tusciae ähnelt in seinen thermoacidophilen Eigenschaften sehr dem 1971 von DARLAND und BROCK beschriebenen heterotrophen ersten obligat

* alle zitiert nach CLAUS und BERKELEY (1986)

thermoacidophilen B. acidocaldarius. Er wächst bei Temperaturen zwischen 45 und 70 °C und bei pH 2 bis pH 6.

B. a. wurde bisher aus Quellen und Bodenproben der verschiedensten Weltgegenden isoliert. Zum Beispiel isolierten DARLAND und BROCK (1971) Stämme aus sauren, heißen Quellen im Yellowstone Nationalpark und auf Hawai. OSHIMA et al. (1977) und UCHINO und FUKUDA (1982) isolierten Stämme aus japanischen Quellen, DE ROSA et al. (1971-1973) konnten B. a. aus heißen Quellen bei den Vulkangebieten von Neapel isolieren. LOGINOVA et al. (1978) isolierten Stämme von B.a. aus heißen Quellen in der Sowjetunion, die zum Teil auch neutralen pH besaßen, allerdings in der Nähe saurer Quellen gelegen waren. Bis auf diese letztgenannten Isolate wurden alle isolierten B.a. Stämme in Habitaten gefunden, die sowohl saure (zwischen pH 2,5 und pH 4,2) als auch heiße Bedingungen (55 °C und 70 °C) boten.

Von anderen thermophilen Bacillus-Arten ist allerdings bekannt, daß sie auch aus Umgebungen isoliert werden können, die ihnen keine Möglichkeit zum Wachstum geben. So konnte B. stearothermophilus aus arktischen Böden und Wasser (BOYD und BOYD, 1962) und von BARTHOLOMEW und PAIK (1966) aus Tiefseewasser isoliert werden. Es ist zwar versucht worden, das Vorkommen Thermophiler in kalten bis kältesten Umgebungen zu erklären, bisher ist das aber noch nicht ganz gelungen (NORRIS et al., 1981).

Die meisten Bacillus-Arten können ubiquitär aus Boden, Wasser oder Lebensmitteln isoliert werden. Hierfür ist mit Sicherheit die Fähigkeit zur Sporenbildung von großer Bedeutung. Auf diese Weise können die Bacilli ungünstige Bedingungen überdauern, um, wenn dann Bedingungen eintreten, die für das Wachstum der speziellen Art günstig sind, metabolisch aktiv zu werden (CLAUS und BERKELEY, 1986).

HIPPCHEN et al. (1981) versuchten aus normalen Garten- und Waldböden B. acidocaldarius zu isolieren. Dazu benutzten sie eine Anreicherungsmethode mit von DARLAND und BROCK (1971) beschriebenen Medien. Tatsächlich gelang es, thermoacidophile Bacillus-Stämme zu isolieren. Diese teilten die auffälligsten Eigenschaften von B. a.. Neben Thermoacidophilie zeigten sie vor allen Dingen ein sehr ähnliches Fettsäurespektrum.

B.a. war bis dahin der einzige Bacillus, der w-Cyclohexanfettsäuren besaß (DE ROSA et al., 1971). Außerdem besitzt er Hopanoide (DE ROSA et al., 1973, LANGWORTHY et al., 1976) und ein bei nichtphototrophen

Bakterien selten gefundenes Sulfonolipid, welches negativ geladen ist (HAINES, 1971, zitiert nach LANGWORTHY und POND, 1986). Mit diesem Lipidmuster wich B.a. von allen bis dahin bekannten Bacillus-Arten ab. Diese besitzen nämlich neben geradkettigen Fettsäuren vorwiegend iso- und anteisoverzweigtkettige Fettsäuren (KANEDA, 1977).

OSHIMA et al. (1976) und KRULWICH et al. (1978) fanden, daß der intracelluläre pH von B. acidocaldarius nur wenig unter pH 7 liegt, während das umgebende Medium pH 3 hat. Da die Zellmembran die Barriere zwischen Zellinnerem und dem umgebenden Medium ist, war anzunehmen, daß die B.a. Membran mit ihrer besonderer Zusammensetzung, eine spezielle Anpassung an die heißen, sauren Bedingungen ist, die B.a. zum Wachstum benötigt. So konnten KANNENBERG et al. (1984) zeigen, daß Monolayer aus w-Cyclohexanfettsäurehaltigen Lipiden mit steigender Temperatur langsamer in den flüssigen Zustand übergehen, als Membranen aus Lipiden mit geradkettigen Fettsäuren. Liposomen aus w-Cyclohexanfettsäurehaltigen Lipiden zeigen auch bei Temperaturen oberhalb der Phasenübergangstemperatur relativ niedrige Permeabilität für ungeladene, kleine Moleküle. Daraus ist zu schließen, daß diese Membranen eine geringere Fluidität, d.h. dichtere Packung im Gegensatz zu Membranen aus geradkettigen Fettsäuren besitzen (KANNENBERG et al., 1984). Weitere Hinweise zur speziellen Funktion der w-cyclischen Fettsäuren bei hohen Temperaturen und niedrigem pH konnten DREHER et al. (1976) erbringen. Sie fütterten B. subtilis mit cyclischen Fettsäurevorstufen, die in die Membran eingebaut wurden und zum Teil Wachstum bei höheren Temperaturen und niedrigeren pH-Werten ermöglichten. KRISCHKE (1986) konnte an B. acidocaldarius-Mutanten, die auxotroph für Vorstufen der w-Cyclohexan Fs sind, zeigen, daß die cyclischen Fs die Widerstandsfähigkeit der Zellen gegen unterschiedliche Arten von Umweltstreß wie hohe Temperaturen, niedrigen pH-Wert und erhöhte Ethanolkonzentration erhöhen. Interessant ist auch, daß bei thermoacidophilen Archaebakterien Cyclopentanringe in den Biphytanylketten ihrer Membranen auftreten (DE ROSA et al., 1980). Bei Sulfolobus bewirkt Temperaturerhöhung einen erhöhten Gehalt an cyclischen Alkylketten (FURUYA et al., 1980)

Auch die in den B.a. Membranen enthaltenen Hopanoide bewirken eine Stabilisierung bei hohen Temperaturen und niedrigen pH-Werten. B.a. zeigt bei Temperaturerhöhung eine stark erhöhte Hopanoid-Bildung (PORALLA et al., 1984). Es ist gezeigt worden, daß Hopanoide einen kon-

densierenden Effekt auf unterschiedlichste Modellmembranen ausüben, und damit cholesterinartig wirken (PORALLA et al., 1980, BENZ et al., 1983, KANNENBERG et al., 1985, KANNENBERG et al., 1986).
Außerdem enthält B.a. ein auch bei stark saurem pH-Wert negativ geladenes Sulfonolipid, das positive Ladungen auf der Oberfläche der Zellen binden soll, und damit das Eindringen positiver Ladungen in das Zellplasma verhindern, oder als Ionenaustauscher wirken soll (LANGWORTHY et al., 1976).

Die thermoacidophilen Bacillus Isolate aus Boden enthielten alle diese von B.a. bekannten Membranlipide (HIPPCHEN et al., 1981, DEINHARD et al., 1987a). Sie wuchsen in ähnlichen Temperatur- und pH-Bereichen wie B.a., ähnelten B.a. morphologisch und zum Teil auch in der C-Quellenverwertung (HIPPCHEN et al., 1981). Weitere Untersuchungen an diesen Stämmen ergaben einige Abweichungen in den physiologischen Eigenschaften der Bodenisolate von B.a., eine eindeutige Abtrennung oder Zusammenführung dieser Stammgruppen durch klassische bakterientaxonomische Methoden gelang nicht (DEINHARD, 1983).
1984 beschrieben CERNY et al. einen weiteren Stamm mit sehr ähnlichen Eigenschaften wie sie die Isolate von HIPPCHEN et al. (1981) besaßen. Dieser Stamm war aus verdorbenem Apfelsaft isoliert worden.
1983 gelang PORALLA und KÖNIG durch direktes Ausplattieren die Isolierung eines weiteren thermoacidophilen Bacillus-Stammes. Dieser Stamm zeichnete sich durch bis dahin noch nie bei irgendwelchen Organismen gefundene Membranfettsäuren aus. Wie bei B.a. und den Isolaten von HIPPCHEN et al. (1981) waren die Fettsäuren w-cyclisiert. Allerdings enthielt der Ring statt sechs C-Atomen sieben. ALLGAIER et al. (1985) konnten nachweisen, daß ein Teil dieser w-Cycloheptanfettsäuren in α-Stellung hydroxyliert vorliegen. Es konnten keine Hopanoide in der Membran gefunden werden. Ein Sulfonolipid wurde nachgewiesen (KRISCHKE, 1983, DEINHARD et al.,1987b). Es konnten auch eine Anzahl weiterer Stämme mit den gleichen Eigenschaften wie bei dem von PORALLA und KÖNIG (1983) gefundenen Stamm isoliert werden (SAAR, 1985).
Die w-Cycloheptan FS haltigen Stämme zeichneten sich zunächst durch eine starke Hefeextraktabhängigkeit aus. Dies ist der Grund, warum sie bei der von HIPPCHEN et al. (1981) benutzten Anreicherungsmethode für Thermoacidophile nicht entdeckt werden konnten.

Sämtliche thermoacidophile, w-cyclisierte Fettsäuren enthaltende Bacillus-Stämme (wie auch viele andere oben genannte Arten) lassen sich mit den Methoden von GORDON et al. (1973) nicht differenzieren. Sie wachsen nicht unter den standardisierten Bedingungen. Um ihre physiologischen Eigenschaften bestimmen zu können, müssen die Medien und Wachstumsbedingungen auf die Bedürfnisse der Stämme abgestimmt werden. Dabei ergibt sich zum einen zwangsläufig das Problem der Vergleichbarkeit, mit der Frage ob physiologisch und metabolisch so unterschiedliche Arten, wie die Gattung sie nun einmal enthält, tatsächlich miteinander verglichen werden können und dürfen (PRIEST, 1981), wie es z.B. in der numerischen Taxonomie notwendig ist. Zum anderen zeigt sich die Notwendigkeit weiterer taxonomischer Methoden, der Analyse der Zellbestandteile. Im Fall der Thermoacidophilen wurde über die Lipidanalyse ein mögliches neues Merkmal in der Gattung Bacillus gefunden.

Es war schon versucht worden, mit abgewandelten klassischen taxonomischen Methoden eine Differenzierung zwischen B.a. und den w-C.hex. Fs haltigen Isolaten zu erreichen. Dieser Versuch gab zwar Hinweise darauf, daß es sich um zwei verschiedene Gruppen handeln könnte, endgültig ließ sich das aber nicht entscheiden (DEINHARD, 1983). Die w-C.hept. Fs haltigen Stämme waren von dieser Untersuchung wegen ihrer Hefeextraktabhängigkeit ausgenommen worden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die metabolischen Eigenschaften unter Verwendung eines kommerziellen Testsystems in größerem Ausmaß festgestellt und numerisch-taxonomisch bearbeitet.

Des weiteren sollte überprüft werden, inwieweit sich die Menachinonanalyse zur Differenzierung der thermoacidophilen Bacilli eignet. In der Literatur konnte man nämlich häufig für B.a. die Angabe nach DE ROSA et al. (1971) finden, daß er statt des bei allen anderen Bacillus-Arten vorkommenden MK-7 (Menachinon mit einer 7 Isoprenylresten langen Seitenkette) MK-9 besitzt (COLLINS und JONES, 1979, MINNIKIN und GOODFELLOW, 1981).

Um eindeutige Relationen unter den thermoacidophilen Bacillus-Stämmen herstellen zu können, sollte die DNA der Stämme untersucht werden.

Die physiologische Heterogenität der Gattung findet in der DNA ihrer Arten ihr Abbild. Die allgemeine Regel besagt, daß Arten, die sich im Guanin+Cytosin-Gehalt ihrer DNA um mehr als 10% unterscheiden, nicht zu einer Gattung gehören, Unterschiede im G+C-Gehalt von über 5% bedeuten die Zugehörigkeit zu verschiedenen Arten (JONES und SNEATH,

1970, BRADLEY und MORDARSKI, 1976). Die in der Gattung Bacillus vereinten Arten besitzen G+C-Gehalte von 32% bei B. anthracis und B. cereus (CLAUS und BERKELEY, 1986) bis 61% bei B.a. (DARLAND und BROCK, 1971) und 69% bei 'B.thermocatenulatus' (GOLOVACHEVA et al., 1975). Aus dieser großen Differenz in den G+C-Gehalten wurde gefordert, die Gattung Bacillus in verschiedene Gattungen aufzuteilen (PRIEST, 1981). Dabei konnten die geforderten Gruppen auch über physiologische Merkmale durch Numerische Taxonomie belegt werden (PRIEST et al., 1981). Allerdings steht dieser Forderung einerseits die taxonomische Tradition entgegen, andererseits würfe eine Unterteilung noch nicht gelöste Identifizierungsprobleme auf. Um bei diesen Problemen, die durch die beiden Hauptaufgaben der Systematik, nämlich die phylogenetische Charakterisierung und Einordnung der Organismen auf der einen und die Identifizierung auf der anderen Seite, zu befriedigenden Lösungen zu gelangen, bedarf es noch diverser Untersuchungen. Durch die Katalogisierung von 16S rRNA Oligonucleotiden konnte bereits bei einigen Bacillus Arten größere phylogenetische Nähe zu asporogenen Arten als bei den Bacillus Arten untereinander nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte sich bei den untersuchten Arten, daß der thermophile B. stearothermophilus phylogentisch näher mit Thermoactinomyces vulgaris verwandt ist, als mit verschiedenen mesophilen Bacillus Spezies (STACKEBRANDT et al., 1987 im Druck). Die größte phylogenetische Ferne zu den anderen Bacillus Arten zeigt B.a. (WOESE, pers. Mitteilg.). Um die thermoacidophilen Stämme eindeutig zu Arten ordnen zu können, sollten DNA/DNA Hybridisierungen durchgeführt werden, da gleicher G+C-Gehalt der DNA zweier Organismen nicht notwendig bedeutet, daß es sich bei beiden um die gleiche Art handelt, die Hybridisierung zweier DNA-Proben unterschiedlicher Organismen jedoch ein sicherer Maßstab für die Verwandtschaft der beiden auf der Art-Ebene ist (PRIEST, 1981).

Diese Arbeit sollte einerseits die Artzugehörigkeit der thermoacidophilen Bacillus Isolate von HIPPCHEN et al., 1981 und CERNY et al., (1984) sowie der Isolate von PORALLA und KÖNIG (1983) und SAAR (1985) klären. Zum anderen sollte eine möglichst einfache Differenzierungsmöglichkeit innerhalb der thermoacidophilen Bacillus-Arten aufgezeigt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. CHEMIKALIEN

Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:
Boehringer GmbH, Mannheim: DNA-Polymerase (Kornberg-Polymerase), 2'-Desoxy-thymidin-5'-triphosphat, 2'-Desoxy-adenosin-5'-triphosphat, 2'-Desoxy-cytidin-5'-triphosphat, 2'-Desoxy-guanosin-5'-triphosphat Serva, Heidelberg: Pronase E von Streptomyces griseus, Natriumdodecylsulfat (SDS), Cetyltrimethylammoniumbromid
Pharmacia Fine Chemicals AB Upsalla, Schweden: Sephadex, Ficoll 400
Sigma, München: Ribonuclease A, Desoxyribonuclease I, Lysozym, Rinderserumalbumin (BSA), Dithioerythrytol
Difco Laboratories, Detroit, Mich.: Bacto-Yeast-Extract, Bacto-Agar
Maizena GmbH., Heilbronn: D-Glucose-Monohydrat
Bio-Rad Laboratories, Richmond, Cal.: Biogel P 100 Polyarylamid
Amersham International, Buckinghamshire: α-^{32}P-dCTP
Amersham International, Buckinghamshire: (Methyl-^{3}H)TTP
Die übrigen Chemikalien wurden als analysenreine Substanzen von MERCK AG, Darmstadt, bezogen.

2.2. ORGANISMEN

Die in dieser Arbeit benutzten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

2.3 MEDIEN

2.3.1. Flüssigmedien

Bacillus acidocaldarius Medium = BAM: 0.25 g $CaCl_2$ x 2 H_2O, 0.5 g $MgSO_4$ x 7 H_2O, 0.2 g $(NH_4)_2SO_4$, 1 g Hefeextrakt, 5 g Glucose, 1 ml Spurenelement-Lösung (FARRAND et al., 1983), 1 l H_2O. Der pH wurde vor dem Autoklavieren auf pH 4, wenn nicht auf die in den einzelnen Versuchen beschriebenen Werte, mit 1 N H_2SO_4 eingestellt.

Tabelle 1: Aufstellung der benutzten Bakterienstämme

Art	Stamm	Herkunft
Bacillus acidocaldarius	ATCC 27009	ATCC
"	DSM 448	DSM
"	DSM 449	"
"	DSM 451	"
"	DSM 452	"
"	DSM 453	"
"	DSM 454	"
"	DSM 455	"
Bacillus coagulans	ATCC 7050	ATCC
Bacillus subtilis	DSM 10	DSM
Escherichia coli	K12	Dr. K.G. HANTKE
Rhodococcus sp.	DSM 43 246	DSM
Rhodococcus rhodochrous	DSM 43 241	DSM
Bacillus sp. (w-C.hex. Fs)	GD3B/DSM 3922^{T}	HIPPCHEN et al., 1981
"	E1	"
"	ND2B	"
"	GK2B	"
"	MD2A	"
"	B 50	"
"	MD3A	"
"	B 45 /DSM 3923	"
"	GD1A /DSM 3924	"
"	GD2C	"
"	GD1B	"
"	G1	Dr. K.PORALLA
"	DSM 2498	CERNY et al., 1984

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung **Tabelle 1**

Art	Stamm	Herkunft
Bacillus sp.		
(w-C.hept. Fs)	SCH /DSM 4006^T	PORALLA und KÖNIG, 1983
"	SAW 15	SAAR, 1985
"	SAW 17	"
"	SAW 21	"
"	SGE 15	"
"	SGE 21/DSM 4007	"
"	SKP 16	"
"	SKP 21	"
"	SWA 15	"
"	SWA 17	"
"	SWA 21	"
"	BGPFK	Dr. K. PORALLA
"	GPFLK	"
"	S 5 /DSM 4005	SAAR, 1985
"	F 1	Dr. K. PORALLA

B. cycloheptanicus Medium = SM: enthielt die gleichen Bestandteile wie BAM, bis auf den höheren Hefeextrakt-Gehalt von 3 g. Wenn nicht anders beschrieben, wurde pH 4.3 eingestellt.

Spurenelemente-Lösung (FARRAND et al., 1983): 0.66 g $CaCl_2 \times 2\ H_2O$, 0.18 g $ZnSO_4 \times 7\ H_2O$, 0.16 g $CuSO_4 \times 5\ H_2O$, 0.15 g $MnSO_4 \times H_2O$, 0.18 g $CoCl_2 \times H_2O$, 0.1 g H_3BO_3, 0.3 g $Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$, 1 l H_2O.

Bacillus coagulans-Medium: 10 g Glucose, 5 g Hefeextrakt 1 l Leitungswasser, pH 5,5.

Bacillus subtilis-Medium: wie Bacillus coagulans Medium, pH 7.

Rhodococcus sp. (DSM 43 246) Medium: 5 g Pepton, 3 g Fleischextrakt, 20 g Glycerin, 150 ml Bodenextrakt, 850 ml Leitungswasser, der pH

wurde auf 7 eingestellt. Das Medium wurde nach dem DSM-Katalog (CLAUS et al.,1983) angesetzt.
Bodenextrakt wurde hergestellt wie folgt: Luftgetrocknete Gartenerde wurde gesiebt, um gröbere Teile zu entfernen. Jeweils 40 g Erde wurden mit 960 ml Leitungswasser suspendiert, und 1 h bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde der Überstand sorgfältig dekantiert und durch ein Papierfilter gefiltert. Das Filtrat wurde in 200 ml Portionen eingeteilt , nochmals 20 min autoklaviert, bei Raumtemperatur aufbewahrt bis die Lösung durch Sedimentation aufgeklart war. Danach wurde sie im obigen Medium benutzt.

Rhodococcus rhodochrous (Typstamm) (DSM 43241) Medium: 4 g Glucose, 4 g Hefeextrakt, 10 g Malzextrakt (12 g Agar), 1 l H_2O. Der pH war 7,2. (DSM-Katalog, 1983)

2.3.2. Agar-Medien aus B. acidocaldarius-Medium (BAM), B. cycloheptanicus-Medium (SM) und B. coagulans-Medium

Da bei saurem pH und hohen Temperaturen Agar hydrolysiert wird, wurden Agar und die übrigen Medienbestandteile jeweils doppelt konzentriert angesetzt, der pH nur in dem Kolben, der Salze, Zucker und Hefeextrakt enthielt, eingestellt, dann autoklaviert und danach bei etwa 50 °C gemischt.
Die Endkonzentration des Agar war 3%. Die Agar-Platten enthielten etwa 30 ml Medium.

2.3.3. Agar-Medien für die mesophilen Stämme

Vor dem Autoklavieren wurde den Medien Agar in folgenden Mengen zugesetzt: B. subtilis- und Rhodococcus sp.-Medium enthielten 15 g Agar/l Medium. Rhodococcus rhodochrous Medium enthielt 12 g Agar/l.

2.4. ANZUCHTBEDINGUNGEN

2.4.1. Inkubationstemperaturen der Stämme

B. acidocaldarius, die w-C.hex. Fs haltigen Stämme und die w-C.hept. Fs haltigen Stämme wurden, wenn nicht anders angegeben bei 50 °C

inkubiert.

B. coagulans, Rhodococcus sp. wurden bei 37 °C, B. subtilis wurde bei 30 °C inkubiert.

Rhodococcus rhodochrous wurde bei 28 °C angezogen.

2.4.2 Anzucht auf Agar-Platten

Die Stämme wurden auf den entsprechenden Medien ausgestrichen, und bei den entsprechenden Temperaturen angezogen. Wenn bei hoher Temperatur inkubiert wurde, wurden die beimpften Platten mit 1 l Bechergläsern überdeckt, um den Flüssigkeitsverlust möglichst gering zu halten.

2.4.3. Flüssigkulturen

Flüssigkulturen wurden im allgemeinen in 500 ml Erlenmeyer-Kolben mit je 100 ml Medium angesetzt, die bei den entsprechenden Temperaturen auf der Schüttelmaschine bei 120 upm inkubiert wurden. Angeimpft wurde mit einer Impföse von Zellen einer gutgewachsenen Plattenkultur.

20 l Fermenter (Glasfermenter, Biolafitte, Modell C6) wurden mit 10 bis 15 l Medium gefüllt und 30 min bei 134 °C autoklaviert. Nach Einstellen der jeweiligen Inkubationstemperatur wurde mit 500 bis 600 ml einer gutwachsenden Vorkultur angeimpft und bei 300 upm (Blattrührer) und ca. 30 l Luft/min inkubiert. Die Zellen wurden entweder in der stationären Phase (für die Menaquinon-Analysen) oder in der frühen log-Phase (für DNA-Extraktionen) geerntet.

2.5. ERNTE DER ZELLEN

Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert (5000 upm, Sorvall Superspeed RC 2-B), mit Salzlösung (8 g NaCl, 1 g $MgSO_4$ x 7 H_2O, 1 l H_2O, pH 5) gewaschen. Sollte das Zellmaterial länger aufbewahrt werden, wurde es entweder bei -21 °C eingefroren, oder lyophylisiert (Leybold Heraeus, Gerät GT 2) und danach bei -21 °C aufbewahrt.

2.6. AUFBEWAHRUNG DER STÄMME

Für kürzere Aufbewahrungszeiten (maximal 2 Wochen) wurden die Stämme auf Agar-Platten bis zur Sporulation angezogen, anschließend im Kühlschrank, oder thermoacidophile Stämme auch bei Zimmertemperatur gelagert.

Zur Langzeitkonservierung wurden die Stämme auf Agar-Platten bis zur Sporulation inkubiert. Eine Impföse voll Zellen wurde dann in 1 cm^3 bei 180 °C sterilisiertes Kieselgel (Korngröße 0.063-0.200 = 70-230 mesh ASTM) in Schraubdeckelgläschen schnell eingerührt, und bei - 21 °C aufbewahrt. Zur Wiederanzucht wurden etwa 0.3 cm^3 auf eine Agar-Platte aufgestreut und inkubiert. Nach ein bis zwei Verdünnungsausstrichen wurden die Stämme dann wieder in Versuchen verwendet.

2.7. ANWENDUNG DES API-CH50-TESTSYSTEMS

Das API-CH50-Testsystem wird von der Firma BioMerieux hergestellt. Es ist ein Schnelltest, der zur Feststellung der Verwertung von Kohlenstoffquellen dient.
Vom Hersteller werden folgende Testbestandteile geliefert:
a) pro Test fünf Streifen auf denen insgesamt 50 Teströhrchen angebracht sind. 49 enthalten Kohlenstoff-Verbindungen, die als C-Quellen dienen können, als Trockensubstanz. Außerdem ist ein leeres Vergleichs-Röhrchen vorhanden,
b) eine Inkubationswanne mit Deckel pro Test,
c) ein Protokollbogen pro Test
Vom Hersteller wird außerdem ein spezielles Bacillus-Medium angeboten, welches keine C-Quellen enthält, allerdings Pepton und Trypton. Dieses Medium ist für acidophile Organismen nicht geeignet, da es auf pH 7 eingestellt ist. Zur Detektion von Säurebildung ist als Indikator Phenolrot beigegeben, der zwischen pH 6,4 und pH 8,2 von gelb nach rot umschlägt.
Für die acidophilen Organismen dieser Studie mußte also ein Medium hergestellt werden, in welchem Wachstum möglich und eventuelle Säurebildung zu beobachten ist.

Tabelle 2: Liste der im API-CH50-Test enthaltenen C-Quellen (die Nummer entspricht der Röhrchennummer der Teststreifen).

0) Kontrolle	17) Inositol	34) Melezitose
1) Glycerin	18) Mannitol	35) D-Raffinose
2) Erythritol	19) Sorbitol	36) Stärke
3) D-Arabinose	20) α-Methyl-D-mannosid	37) Glycogen
4) L-Arabinose	21) α-Methyl-D-glucosid	38) Xylitol
5) Ribose	22) N-Acetyl-glucosamin	39) ß-Gentiobiose
6) D-Xylose	23) Amygdalin	40) D-Turanose
7) L-Xylose	24) Arbutin	41) D-Lyxose
8) Adonitol	25) Esculin	42) D-Tagatose
9) ß-Methyl-xylosid	26) Salicin	43) D-Fucose
10) Galaktose	27) Cellobiose	44) L-Fucose
11) D-Glucose	28) Maltose	45) D-Arabitol
12) D-Fructose	29) Lactose	46) L-Arabitol
13) D-Mannose	30) Mellibiose	47) Gluconat
14) L-Sorbose	31) Saccharose	48) 2-Keto-Gluconat
15) Rhamnose	32) Trehalose	49) 5-Keto-Gluconat
16) Dulcitol	33) Inulin	

Die Substanzen sind so proportioniert, daß bei Füllung der Röhrchen für aerobes Wachstum die C-Quellen Konzentration etwa 5 g/l beträgt. Im Esculin-Röhrchen ist außerdem als Indikator für die Hydrolyse Eisencitrat enthalten.

2.7.1. Vorversuche zur Medien-Herstellung

2.7.1.1. Salze und Hefeextrakt

Es wurden die Salze des BAM Mediums benutzt. Da die w-C.hept. Fs haltigen Stämme zusätzlich Hefeextrakt benötigen, wurde dem Medium 0,5 g Hefeextrakt zugegeben. Der pH wurde auf 4,3 eingestellt. Es wurden 10 ml Flüssigkulturen in 100 ml Erlenmeyerkolben angesetzt und bei 50 °C inkubiert.
Ausgewählte Stämme wurden auf Wachstum getestet.

2.7.1.2. Auswahl des Indikators

Es war bekannt, daß B.a. und die w-C.hex. Fs haltigen Stämme bei Wachstum mit Glucose Säure bilden können (DEINHARD, 1983). Um die Säurebildung optisch verfolgen zu können muß dem Medium ein Indikator zugesetzt werden. Da der Anfangs-pH des Mediums pH 4.3 war, konnte Phenolrot nicht benutzt werden. Die bei diesem pH-Wert sinnvoll einsetzbaren Indikatoren sind Bromphenolblau, das zwischen pH 4.6 und pH 3 von blau nach gelb umschlägt und Bromkresolgrün, das zwischen pH 5.4 und pH 3.6 von grün nach gelb umschlägt.
Die Indikatoren wurden in Konzentrationen von 10 mg/l, 15 mg/l und 20 mg/l Flüßigmedium zugesetzt und das Wachstum wie in 2.7.1.1. getestet.

2.7.2. Beimpfen und Inkubation

Die Stämme wurden über Nacht in 100 ml des entsprechenden Mediums (BAM oder SM) bei 50 °C wie in 2.4.2. beschrieben angezogen.
Die Zellen wurden abzentrifugiert und gewaschen. Danach wurde das Pellet in 1 ml Salzlösung suspendiert. 0,01 ml dieser sehr dichten Suspension wurden in 5 ml Salzlösung gebracht. Die OD dieser Suspension wurde bei 546 nm im Eppendorf-Photometer gemessen. Dieser Wert diente dazu, das Testmedium mit der richtigen, d.h. in jedem Test gleichen Menge von Zellen anzuimpfen. Da das Testmedium mit Indikator versehen war, wurden diese Messungen in ungefärbter Salzlösung vorgenommen.

20 ml des Testmediums wurden zu einer OD von 0,5 angeimpft. Die Menge der Stammsuspension, die dazu benötigt wird, ist:

$$\frac{0{,}5 \cdot 0{,}04}{\text{gemessene OD}}\ \text{ml} = \quad n\ \text{ml}$$

Mit dem beimpften Testmedium wurden nun die Teströhrchen (pro Röhrchen 300 µl) für aerobes Wachstum, d.h. auch im oberen Teil, gefüllt. Die Streifen mit den Teströhrchen wurden in die Inkubationswanne, in die vorher noch etwa 10 ml steriles Wasser eingefüllt worden war, gelegt, die Wannen wurden verschlossen, und bei 50 °C im Wärmschrank inku-

biert. Dabei wurde in der Inkubationswanne Wasser nachgefüllt, um bei der hohen Inkubationstemperatur die Verdunstung des Mediums so gering wie möglich zu halten.

Mit den Stämmen ATCC 27009, GD3B, SCH und GD1A wurde der Test wenigstens drei Mal durchgeführt, um sicherzustellen, daß die Ergebnisse reproduzierbar waren.

2.7.3. Ablesen der Testergebnisse

Die Testergebnisse wurden sechs Tage lang alle 24 h abgelesen. Registriert wurde zum einen ob Säurebildung stattgefunden hatte, zum anderen wie stark die Säurebildung war.
Die Säurebildung konnte ohne weiteres in vier verschiedene Stufen eingeteilt werden. Die den Stufen entsprechenden genauen pH-Werte wurden nicht gemessen. Die Ergebnisse wurden für das Numerische Taxonomie Programm (s. 2.8.) codiert wie folgt:

0 = keine Säurebildung sichtbar, d.h. die Färbung des Teströhrchens unterschied sich nicht von Röhrchen 0.
1 = leichte Säurebildung, d.h. gegenüber dem Röhrchen 0 war eine leichte Aufhellung sichtbar.
2 = deutliche Säurebildung, d.h. im Vergleich zu Röhrchen 0 fiel auf Anhieb die hellere, hellblaue bis gelbliche Farbe des Teströhrchens auf.
3 = starke Säurebildung, das Teströhrchen war deutlich gelb im Gegensatz zur Kontrolle.

Eine einzige Ausnahme von dieser Codierung wurde bei der Bewertung des Esculin-Röhrchens gemacht. Da bei der Hydrolyse des Esculins mit dem als Indikator im Teströhrchen enthaltenen Eisencitrat ein intensiv braunschwarzer Farbstoff entsteht, konnte hier die Säurebildung nicht beobachtet werden. Es wurde nur Hydrolyse des Esculins (1) oder keine Hydrolyse (0) protokolliert.
Für das Numerische Taxonomie-Programm wurden diejenigen Testergebnisse mit der jeweils stärksten Säurebildung übernommen. (s. 2.8.)

2.8. NUMERISCHE TAXONOMIE

Die Ergebnisse des API-CH5O-Tests wurden mit den Mitteln der Numerischen Taxonomie ausgewertet.
Zu diesem Zweck war das schon bestehende Num.-Tax. Computerprogramm (DEINHARD, 1983) um die Möglichkeit der Clusteranalyse komplettiert worden.

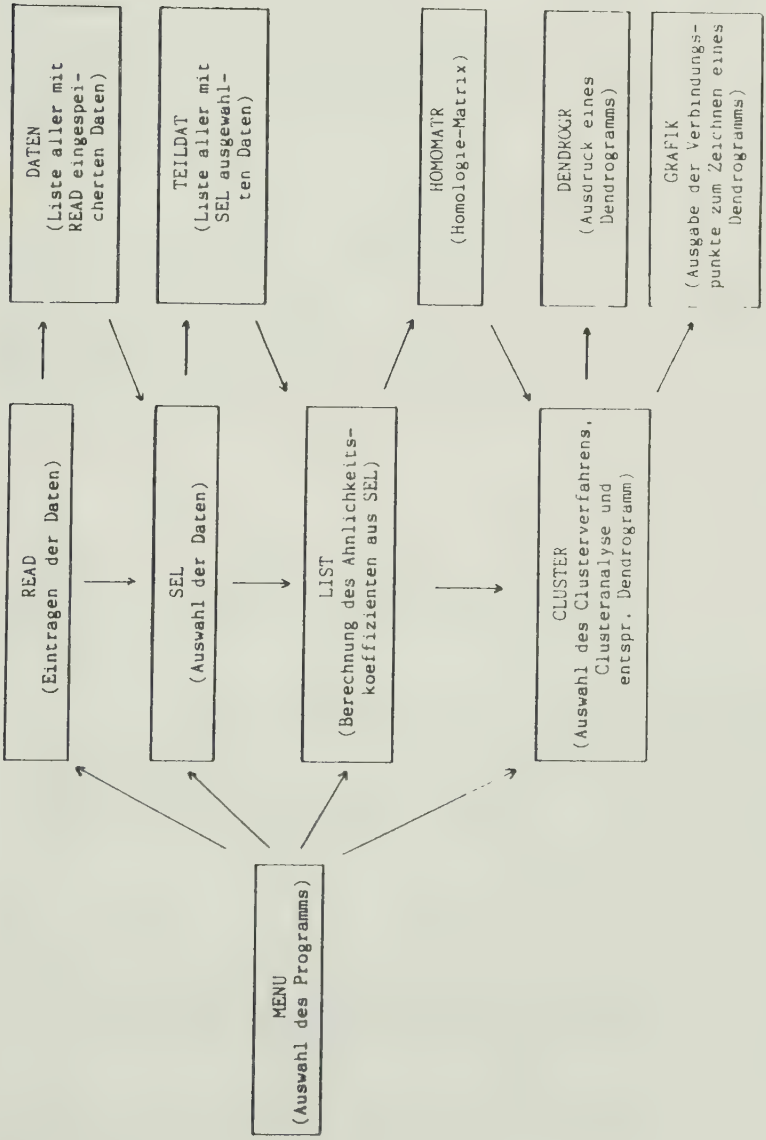
2.8.1. Beschreibung des Num.-Tax. Computerprogramms

Das Num.-Tax. Programm (G. DEINHARD, W. HELLRUNG, P. BLANZ, K. PORALLA) wurde von Dipl.-Ing. W. HELLRUNG geschrieben. Die ursprüngliche Fassung, mit welcher hier gearbeitet wurde, läuft auf dem Apple II (CP/M). Inzwischen wurde auch eine Sirius-kompatible und für die DSM eine IBM kompatible (MS-DOS) Fassung des Programms hergestellt.
Das Num.-Tax. Programm besteht aus verschiedenen Unterprogrammen. Die Unterprogramme MENU (Auswahl der Programme), READ (Einlesen der Bakterien und ihrer Eigenschaften), SEL (Auswahl der zu bearbeitenden Bakterien und Eigenschaften) und LIST (Berechnung der Ähnlichkeitskoeffizienten von SOKAL und MICHENER, 1958) sind in Basic, das Programm CLUSTER (Clusteranalyse mit acht Verfahren, Darstellung des Ergebnisses in einem Dendrogramm, und Angaben zur Konstruktion des Dendrogramms) ist in FORTRAN basierend auf den Algorithmen von STEINHAUSEN und LANGER (1977) geschrieben.
Es besteht die Möglichkeit, 100 Organismen mit je 255 vom Benutzer selbst zu definierenden Eigenschaften, die mit den Zahlen von 0 bis 9 codiert werden können, zu speichern und zu bearbeiten.
Die Unterprogramme bzw. Dateien sind mit ihren Beziehungen untereinander bzw. aufeinander in Abb. 1 dargestellt.

2.8.2. Codierung der Ergebnisse des API-CH5O-Tests

Die Ergebnisse des API-CH5O-Tests wurden wie oben (2.7.) beschrieben codiert. Zur Berechnung der Ähnlichkeitskoeffizienten wurden pro Kohlenstoffquelle zwei Werte eingegeben:
1 oder 0 für Säurebildung oder keine Säurebildung, dazu wurde ein Wert eingegeben, der den Grad der stärksten Säurebildung bei der ensprechenden C-Quelle ausdrückte.

Abb. 1.: Graphische Darstellung des Zusammenhangs der Dateien des Num.-Tax. Programms



2.8.3. Der Ähnlichkeitskoeffizient

Der im Num.-Tax.-Programm benutzte Ähnlichkeitskoeffizient ist der Simple Matching Koeffizient nach SOKAL und MICHENER (1958).
Mit diesem Koeffizienten wird keine besondere Gewichtung übereinstimmender oder nicht übereinstimmender Eigenschaften erzielt. Das Programm berücksichtigt nicht getestete Eigenschaften einzelner Organismen, sodaß auch Organismen mit nicht ganz vollständigen Datensätzen mit in die Analyse einbezogen werden können. (vergl. DEINHARD, 1983).

2.8.4. Das Average-Linkage Clusteranalyse Verfahren

Zur Clusteranalyse wurde das ungewichtete Average-Linkage Verfahren gewählt, da es nicht wie das Single Linkage Verfahren den einzelnen Organismus mit dem ihm ähnlichsten Vertreter einer bestehenden Gruppe verbindet, sondern die Ähnlichkeit der Gruppe mit dem zuzufügenden Organismus in die Berechnung mit einbezieht (JONES und SACKIN, 1980).

2.9. **MENACHINONE**

2.9.1. Extraktion der Menachinone

Die Extraktion der Menachinone wurde nach der Methode von KROPPENSTEDT (1981) durchgeführt.
Im Allgemeinen wurden entweder 1 g frische, gewaschene Zellen aus einer Übernachtkultur oder 0,5 g gefriergetrocknete Zellen pro Ansatz eingesetzt.
Gefriergetrocknete Zellen wurden in 25 ml Chloroform/Methanol (1/1, v/v) über Nacht extrahiert. Die Zellreste wurden abfiltriert. Der Überstand wurde auf dem Rotationsverdampfer bei 30 °C getrocknet, dann in 5 ml Aceton aufgenommen.
Frische, gewaschene Zellen wurden in 25 ml Aceton aufgenommen, 2 mal 4 min beschallt (Sonifier B 12, Branson Sonic Power Comp., Einstellung 4). Die Zellreste wurden bei 5900 upm abzentrifugiert, und der Überstand getrocknet wie oben, dann in 5 ml Aceton aufgenommen.
Das weitere Verfahren war für die Extrakte aus lyophilisierten und aus frischen Zellen gleich.
Die Acetonlösungen wurden filtriert (Whatman Filter), erneut ein-

geengt, und in etwa 0,250 ml Aceton aufgenommen.
Die Menachinonextrakte wurden nun mittels DC gereinigt. Sie wurden auf eine aktivierte (30 min bei 120 °C) Kieselgel GF 60 Platte Schichtdikke 0,4 mm (Merck) als etwa 2 - 3 cm lange Striche aufgetragen. Als Referenzsubstanz diente Vitamin K_1. Laufmittel war Petrolbenzin/Diethylether (85/15, v/v). Die Menachinone sind unter UV-Licht als purpurfarbene Flecken erkennbar.
Die entsprechenden Flecken wurden ausgekratzt, und in je 1,5 ml Aceton extrahiert, das Kieselgel wurde in der Eppendorf-Zentrifuge abgetrennt. Danach wurden die Menachinonextrakte auf dem Rotationsverdampfer wie oben getrocknet und danach in etwa 100 µl Aceton aufgenommen. Diese Lösung wurde zur Identifizierung der Menachinonhomologen benutzt.

2.9.2. Herstellung der $AgNO_3$-DC-Platten

Kieselgel 60 $_{F\ 254}$ DC-Platten wurden 2 min in eine Lösung aus 10 ml H_2O, 90 ml Aceton und 2 g $AgNO_3$ gelegt, danach luftgetrocknet, und dann 10 min bei 70 °C aktiviert. Die Platten wurden immer frisch zur Benutzung präpariert, da sie lichtempfindlich sind.

2.9.3. Trennmethoden

2.9.3.1. Dünnschichtchromatographie

$AgNO_3$-DC

20 bis 50 µl jedes Menachinonextrakts wurden punktweise auf die $AgNO_3$-DC-Platte aufgetragen. Laufmittel war Benzol/Methanol (95/5,v/v) (KROPPENSTEDT, 1982).
Die Detektion der Menachinone erfolgte mit 3,5% Molybdatophosphat-Lösung. (STAHL, 1967)

RP-18-HPDC

Es wurden HPTLC-RP-18$_{F\ 254}$ Platten benutzt (Merck). 10 bis 20 µl der Menachinonextrakte wurden punktweise aufgetragen. Laufmittel war Ace-

ton/Wasser (99/1, v/v). Detektion der Menachinonhomologen erfolgte mittels UV-Licht (254 nm) (KROPPENSTEDT, 1982).

2.9.3.2. RP-18-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Menachinone wurden über eine RP-18-Säule (Shandon ODS, Nr.5198+VS) mit einem Laufmittelgradienten aus Acetonitril (100% nach 60%) und Tetrahydrofuran (0% nach 40%) mit 2 ml/min getrennt. Die Detektion erfolgte mittels UV-Absorption bei 250 nm (abgewandelt nach KROPPENSTEDT, 1982).

2.9.4. Analytik der Menachinone

2.9.4.1. Aufnahme von UV-Spektren von Menachinonmischungen

Die Menachinonmischungen wurden in Isopropanol gelöst. Auf dem Gilford-Spektrometer (Gilford Spectrophotometer 250), welches automatisch Absorptionsspektren messen und registrieren kann, wurden die Mischungen gegen Isopropanol bei 230 bis 350 nm gemessen.

2.9.4.2. Identifizierung der Menachinonhomologen

Die Menachinonhomologen wurden anhand von Menachinonstandardlösungen (R.M. KROPPENSTEDT) auf der DC und der HPLC durch Vergleich der R_f-Werte identifiziert.
Es wurden Menachinonextrakte der folgenden Organismen benutzt (das hauptsächlich vorhandene Menachinon ist in Klammern angegeben:
Dabei entspricht z.B. die Bezeichnung MK-9 ein Menachinon mit 9 Isoprenylresten in der Seitenkette, sind in der Seitenkette gesättigte Bindungen enthalten, werden diese als H2 (eine gesättigte Bindung), H4 (zwei gesättigte Bindungen) usw. bezeichnet.
DSM 43 753 Thermoactinomyces vulgaris (MK-9)
DSM 43 756 Mycobacterium smegmatis (MK-9(H2))
DSM 40 236 Streptomyces griseus (MK-9(H6))
DSM 43 757 Nocardia asteroides (MK-8(H4))
ID 34 Rhodococcus sp. (MK-8(H2))
DSM 9 Bacillus lentus (MK-7)
Aus den folgenden Organismen wurden Menachinonextrakte als weitere

Vergleichssubstanzen hergestellt:
DSM 43 246 Rhodococcus sp. (MK-9)
DSM 43 241 Rhodococcus rhodochrous (MK-8(H2))
DSM 10 Bacillus subtilis (MK-7)
ATCC 7050 Bacillus coagulans (MK-7)

Die Anzucht der Zellen erfolgte wie in 2.4. beschrieben.

2.10. DNA: G+C-GEHALT UND HYBRIDISIERUNG

2.10.1. DNA-Extraktion

Die Stämme wurden in ihren jeweiligen Medien angezogen und in der frühen log-Phase geerntet.
Versuche, die Zellen aus späteren Wachstumsphasen für die DNA-Extraktion aufzuschließen, scheiterten bei den w-C.hex. Fs haltigen Stämmen. Die w-C.hept. Fs haltigen Stämme ließen sich in allen Wachstumsphasen aufschließen, wie auch die getesteten B.co. Stämme. Um aber alle Stämme gleich zu behandeln, wurde in allen Fällen die DNA extrahiert, wie folgt:
Die geernteten Zellen wurden zwei Mal mit EDTA-Saline gewaschen (0.15 M NaCl, 0.01 M Na-EDTA, pH 8, JOHNSON, 1981). Zur DNA-Extraktion wurde die Methode von MARMUR (1961) abgewandelt.
Ungefähr 1 g nasse Zellen wurden in 10 ml EDTA-Saline suspendiert, 1 mg Lysozym wurde pro ml der Suspension zugegeben, und dann 30 min bei 37 °C inkubiert. Um totale Lyse zu erreichen wurden danach pro ml des Ansatzes 20 µl 20% SDS zugegeben. Danach schloß sich sofort ein Proteinverdau an. Dazu wurde Pronase E von Streptomyces griseus (E.C. 3.4.24.4., 8 DMC-U/mg) benutzt. Sie wurde in einer Konzentration von 100 µg pro ml Ansatz eingesetzt, die Inkubationstemperatur war 60 °C, inkubiert wurde über Nacht.
Es schlossen sich mehrere Proteinfällungen mit Phenol an. Dazu wurde der Ansatz mit dem gleichen Volumen Phenol in EDTA-Saline gesättigt versetzt, 5 min geschüttelt, bei 5000 rpm abzentrifugiert. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgehoben, ohne daß die an der Interphase ausgefallenen Proteine mitgenommen wurden. Nach mehrfacher Wiederholung der Phenol-Fällungen, d.h. wenn nur noch wenig Protein ausfiel, wurde eine RNase Behandlung angeschlossen. Pro ml Ansatz wurden 50 µg

RNase, aus der mittels Erhitzen auf 95 °C evtentuell vorhandene DNase-Aktivität entfernt worden war, zugegeben, und 30 min bei 37 °C inkubiert. Daran schlossen sich einige Chloroform/Isoamylalkohol (24/1, v/v) Fällungen an, bei denen weiter Protein ausgefällt wurde. Erschien kein Protein mehr an der Interphase, so wurde eine weitere Phenol-Fällung gemacht, bei 17000 g in der Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert. Konnte man auch nach dieser Behandlung noch Protein entdecken, so wurden weitere Phenol-Fällungen angeschlossen. Im anderen Falle wurde die DNA mit Ethanol aus der wässrigen Phase ausgefällt. Dazu wurde die wässrige Phase mit zwei Teilen eiskaltem 96% Ethanol überschichtet, und die DNA durch vorsichtiges Schütteln möglichst verknäuelt ausgefällt. Präparationen, bei denen keine langkettige DNA auftrat, d.h. kein Knäuel beim Ausfällen sichtbar wurde, wurden über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Danach wurde die DNA abzentrifugiert (5000 rpm, Christ-Zentrifuge), getrocknet und in 0.1 x SSC gelöst. Danach wurde die Menge und die Reinheit (s. 2.10.2.) der DNA spektralphotometrisch gemessen. Die DNA wurde in Lösung bei -21 °C aufbewahrt.

SSC-Puffer = Standard-Citrat-Puffer (MARMUR, 1961): 1xSSC enthält 0,15 M NaCl, 0,015 M Natriumcitrat, pH 7. Der Puffer wurde entsprechend den Angaben entweder verdünnt oder stärker konzentriert angesetzt.

2.10.2. Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Die DNA-Stammlösung wurde 1/20 in 0.1 x SSC verdünnt und gegen den Puffer bei 230 nm, 260 nm und 280 nm im Spektralphotometer gemessen. Bei dieser Verdünnung entspricht der Zahlenwert der Absorption bei 260 nm der Konzentration in mg/ml der DNA in der Stammlösung (JOHNSON, 1981).

Die Reinheit der DNA läßt sich durch das Verhältnis der Absorptionswerte bei 230, 260 und 280 nm feststellen. Bei 230 nm haben Proteine ihre maximale Absorption, bei 280 nm Phenole und bei 260 nm die DNA. Entsprachen die Verhältnisse der Absorptionswerte von 230 nm/260 nm/280 nm 0.5/1/0.5, so war die DNA rein, und konnte zur Bestimmung des Schmelzpunktes u.a. benutzt werden.

Die Konzentrationsbestimmung mit dieser Methode ist relativ grob. Sollten Konzentrationen zwischen 5 und 50 µg DNA/ml nachgewiesen werden, so wurde die Diphenylamin-Methode benutzt.

2.10.3. Bestimmung der DNA-Konzentration mit der Diphenylamin-Methode

Mit dieser Methode wird die Desoxyribose der DNA spezifisch nachgewiesen. (JOHNSON, 1981).
1 ml der DNA-Probe wurde mit 1 ml 20% (w/v) Perchlorsäure versetzt. Dazu wurden 2 ml Eisessig, der 4% (w/v) Diphenylamin enthielt, gegeben. Dazu kamen 0.2 ml einer 0.16% (w/v) Acetaldehydlösung und es wurde über Nacht bei 30 °C inkubiert. Danach wurde die Absorption der Proben bei 595 und 700 nm gemessen und die Differenz berechnet. Eine gleichzeitig angesetzte Verdünnungsreihe bekannter DNA (Heringssperma-DNA) in den Konzentrationen 5, 10, 25, 35 und 50 µg/ml wurde zur Herstellung einer Eichgeraden genauso durchgemessen. Die Konzentrationen der unbekannten DNA-Proben wurden dann aus der Eichgeraden abgelesen. Diese Methode wurde vor allem bei der Beschichtung der Filter zur DNA/DNA-Hybridisierung angewandt.

2.10.4. Bestimmung des G+C-Gehalts der DNA mittels Schmelzpunktbestimmung

Um G+C mol% der DNA bestimmen zu können wurden die Schmelzpunkte (T_m) der verschiedenen DNAs aufgenommen. T_m ist mit dem G+C-Gehalt korreliert. Je mehr Guanin/Cytosin Paarungen in der DNA vorhanden sind, desto höher ist die Schmelztemperatur der DNA (DE LEY, 1970).
Die DNA-Proben wurden zuerst gemeinsam in 0.5 x SSC (1000 faches Probenvolumen) über Nacht dialysiert . Die Probenkonzentration wurde vorher auf 50 µg/ml eingestellt. Als Vergleichs-DNA wurde E.coli DNA auch im selben Ansatz dialysiert.
Die Proben wurden dann in die Thermoküvette des Gilford-Spektrometers 250 gefüllt, über den Thermoprogrammer (Gilford Thermoprogrammer 2527) wurde die Küvettentemperatur von 60 °C auf 98 °C um je 1 °C/min erhöht, das Absorptionsspektrum und die jeweiligen Temperaturen wurden automatisch registriert. Die Thermoküvette enthielt 4 Meßkammern. In einer Messung wurden die Probe-DNA doppelt sowie E.coli-DNA als Standard gegen Puffer gemessen.
Aus der Schmelzkurve wurde die Schmelztemperatur T_m, das heißt die Temperatur bestimmt, bei der die Stränge der DNAs zur Hälfte getrennt vorliegen. T_m ist erreicht, wenn die hyperchromatische Verschiebung

der DNA die Hälfte seiner Höhe erreicht hat. Von diesem Punkt aus läßt sich die Schmelztemperatur ablesen.
Aus den Schmelztemperaturen lassen sich die G+C-Gehalte berechnen. Dazu wurde die folgende Gleichung benutzt (JOHNSON, 1981):

$$G+C\ mol\%_x = G+C\ mol\%_{ref} + 1.99\ (T_{m(x)} - T_{m(ref)})$$

Dabei ist $G+C\ mol\%_{ref}$ der bekannte Guanin+Cytosin Gehalt der Vergleichs-DNA in diesem Falle von E.coli (50.9 G+C mol%). $T_{m(x)}$ und $T_{m(ref)}$ sind die unter den Versuchsbedingungen gemessenen Schmelztemperaturen der Probe- und der Vergleichs-DNA. Der Schmelzpunkt der verschiedenen DNA-Proben wurde jeweils dreimal gemessen. Der G+C Gehalt wurde aus dem Mittelwert der Messungen berechnet.

2.10.5. Radioaktive Markierung der DNA mittels Nicktranslation

2.10.5.1. Tritium-Markierung der DNA

Herstellung der Nick-DNA (JOHNSON, 1981)

Die DNase (DNase I) wurde in 70 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4), der 1 mg/ml BSA und 50% Glycerin enthielt gelöst. Die DNase Konzentration war 1 mg/ml. Verdünnungen wurden mit dem gleichen Puffer hergestellt. Auch die DNA Polymerase I (E. coli) wurde in dem oben beschriebenen Puffer zu 200 U/ml gelöst. Die Enzymlösungen wurden bei -21 °C aufbewahrt.
Die DNA wurde in Tris-$MgCl_2$-Puffer auf 0.2 mg/ml gebracht. Pro ml DNA-Lösung wurden 10 µl der 0,01 mg/ml DNase-Lösung zugegeben und bei 30 °C 1 bis 2 min inkubiert.
Danach wurde die DNase sofort 10 min im 60 °C-Wasserbad inaktiviert. Die Nick-DNA wurde gegebenenfalls bei -21 °C aufbewahrt.

Nick-Translation (JOHNSON, 1981)

Es wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert:
10 µCi (Methyl-^{3}H)-Thymidin-5'-triphosphat
50 µl Nick-DNA

10 µl Tris-Puffer 0,7 M (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol), pH 7,8
5 µl 0,14 M $MgCl_2$
5 µl 0,01 M Dithioerythritol
10 µl Nucleotid-Lösung, die jeweils 2 mM der folgenden Nucleotide enthält: 2-Desoxyadenosin-5'-triphosphat, 2-Desoxycytidin-5'-triphosphat und 2-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
10 µl 0,8 mM Thymidin-5'-triphosphat
10 µl Polymerase I (200 U/ml)

Der Reaktionsansatz wurde 2 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 10% SDS und 10 minütiges Erhitzen bei 60 °C abgebrochen.
Der Reaktionsmix wurde über eine Bio-Gel P 100 Polyacrylamid Säule (Länge 15 cm, Durchmesser 0,6 cm) mit 0,1xSSC, der 0,1% SDS enhielt, gereinigt. Jede Fraktion enthielt 10 Tropfen (etwa 230 µl).
Es wurden 25 Fraktionen gesammelt. Aus jeder wurden 5 µl entnommen, auf 1,5 cm^2 große Filterpapierquadrate (Whatman Nr.1) getropft, trocknen gelassen, und dann im LSC ausgezählt.
Die Fraktionen, die die DNA enthielten wurden vereinigt und bis zu weiterem Gebrauch bei -21 °C eingefroren.

2.10.5.2. ^{32}P-Markierung

Es wurden die folgenden Lösungen zusammenpipettiert:
1 µl DNA-Lösung (1 mg/ml in TE-Puffer)
1 µl dATP (200 M)
1 µl dGTP "
1 µl dTTP "
2 µl 10 x Nicksalz-Lösung
1 µl aktivierte DNase
1 µl Polymerase I
1 µl (=10 µCi) α-^{32}P-dCTP
Mit H_2O wurde auf 20 µl aufgefüllt.
Der Translationsansatz wurde 2,5 h bei 15 °C inkubiert. Danach wurden nicht eingebaute Nucleotide über eine Sephadex G 75 Säule (mit STE-Puffer gewaschen) in einer Pasteurpipette abgetrennt. Dazu wurde der Translationsansatz mit 1 µl carrier-RNA (10 µg/µl) versetzt auf die

Säule gebracht. Es wurden 15 Fraktionen gesammelt, wobei die erste etwa 0,5 ml enthielt, die anderen je 4 Tropfen (etwa 120 µl). Alle Fraktionen wurden im Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt (Cerenkov-Counts, 0,2 min je Probe). Die Fraktionen, die die DNA enhielten, wurden vereinigt, und sofort in den DNA/DNA-Hybridisierungen benutzt.
Aktivierung der DNase: 1 µl DNase-Lösung (1mg/ml 10 mM HCl) wurde 30 min in folgendem Aktivierungspuffer auf Eis inkubiert. Aktivierungspuffer: 1 mg/ml BSA, 10 mM Tris, pH 7,5, 5 mM $MgCl_2$.
TE-Puffer: 10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA.
STE-Puffer: 100 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8.5, 10 mM EDTA.
10 x Nicksalz-Lösung: 500 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM $MgCl_2$, 100 mM Dithiothreitol.

2.10.6. DNA/DNA-Hybridisierung

2.10.6.1. DNA/DNA-Hybridisierung auf Aminophenylthioether-Papier

Für die DNA/DNA-Hybridisierung wurde die Methode von HOWLEY et al. (1979) mit Abwandlungen benutzt, wie im Folgenden beschrieben.
Das Aminophenylthioether-Papier (APT-Papier) stand zur Verfügung (Labor A. Brennicke). Es war nach der Methode von SEED (1982) präpariert worden. Auf dem APT-Papier wird die DNA in denaturierter Form kovalent gebunden. Die Hybridisierung erfolgt dann in ähnlicher Form wie auf Nitrocellulose.

Aufbringen der 'kalten' DNA auf die APT-Filter

Das APT-Papier wurde mit dem Bürolocher zu Filterrondellen gestanzt (Größe: 0,2376 cm^2). Pro DNA-Probe wurden 5 Filter beschriftet.
Die Filterrondelle wurden im Aktivierungsmix (4 mM $NaNO_2$ in 10% HCl) 30 min auf Eis inkubiert. Für 175 Filter wurden 20 ml Aktivierungsmix benutzt. Danach wurden die Filter zwei Mal in kaltem H_2O und einmal in 50 mM Natriumacetat, pH 4, gewaschen.
In der ganzen Prozedur durften die Filter nicht trocken werden.
Die DNA-Proben wurden in TE-Puffer (s. 2.10.5.2.) auf 100 µg/ml gebracht, bei 95 °C 3 min denaturiert, und dann schnell auf Eis abgekühlt.

20 µl der DNA Lösungen wurden auf jeden der 5 entsprechenden Filter gebracht. Die beschichteten Filter wurden mit Petrischalen überdeckt und 2,5 h bei 0 °C inkubiert. Danach wurden die Filter bei 37 °C getrocknet. Die beschichteten Filter wurden entweder bei Raumtemperatur aufbewahrt oder sofort für die Hybridisierung benutzt.

DNA/DNA-Hybridisierung

Die Filter wurden im Vorhybridisierungs-Mix bestehend aus 50% Formamid, 4 x SSC, 0,1 mg/ml hitzedenaturierter Heringssperma-DNA, 1 x Denhardt-Lösung (10 x Denhardt enthält 0,2% Ficoll, 0,2% BSA, 0,2% Polyvinylpyrrolidon) 24 h bei 37 °C inkubiert.
Dann wurde die hitzedenaturierte, ^{32}P-markierte DNA (s. 2.10.3.2.) zu dem Ansatz gegeben. Bei 37 °C wurde 24 bis 72 h hybridisiert.
Um nicht gebundene radioaktive DNA zu entfernen wurden die Filter dann 3 mal 30 min mit Waschpuffer (50% Formamid in 10 x SSC) bei 37 °C gewaschen. Das Formamid wurde durch kurzes Eintauchen der Filter in 2 x SSC entfernt, die Filter wurden bei 37 °C getrocknet.
Die Filter wurden entweder zuerst autoradiographiert oder sofort im LSC gezählt.
In jedem Hybridisierungsansatz wurde außer den Teststamm-DNA Proben auch je ein Filtersatz mit E. coli DNA und mit Heringssperma-DNA als Referenz mitgeführt.

Auswertung

Die Radioaktivität jedes Filters wurde nach der Hybridisierung im LSC ausgezählt, aus den 5 Filtern jeder Probe wurde der Mittelwert berechnet. Der Wert der homologen Hybridisierung wurde als 100% definiert und die Werte der übrigen Proben dazu in Relation gesetzt.

2.10.6.2. DNA/DNA Hybridisierung mittels Nitrocellulose-Filtersystem

Es wurde versucht das Millititer-HA™ (96 wells) Filtrations-System von Millipore zur DNA/DNA-Hybridisierung zu benutzen.
Dieses Filtrationssystem besteht aus Millititer-Platten, deren Boden

aus Triton-freien Nitrocellulose-Filtern (Porengröße 45 µm) besteht, die fest mit dem Plastikkorpus der Platten verbunden sind. Zur Filtration werden die Platten auf einen speziellen Vakuumpumpen-Filterhalter gesetzt. Einzelne Filter können mit einer speziellen Filterstanze aus der Platte entnommen werden.
Es wurde nach einer Kombination der Protokolle der Firma Millipore und der DNA/DNA-Hybridisierungsvorschrift von JOHNSON (1981) vorgegangen.

Aufbringen der 'kalten' DNA auf die Filter

Die DNA-Proben wurden auf 50 µg/ml in 0,1 x SSC gebracht und im kochenden Wasserbad 10 min denaturiert. Danach wurden sie sofort in eiskalte 6 x SSC gegossen, so daß die DNA-Konzentration 5 µg/ml betrug.
Die Millititer-Filterplatten wurden mit H_2O gefüllt und über Nacht stehen gelassen, damit sich die Filterporen mit Wasser füllen konnten. Danach wurden die Filterchen jeweils 4 mal mit eiskalter 6 x SSC gewaschen (insgesamt 1,2 ml). Das Vakuum wurde so eingestellt, daß der Durchlauf einer Filterfüllung (300 µl) etwa eine Minute dauerte.
Danach wurde pro Filterchen 10 µg denaturierte Proben-DNA aufgebracht. Die Filter wurden 4 mal mit eiskalter 6 x SSC gewaschen und an der Luft getrocknet. Danach wurden sie über Nacht im Wärmschrank bei 60 °C 'gebacken'.
Von jeder DNA-Probe wurden jeweils wenigstens 5 Filter beschichtet.

DNA/DNA-Hybridisierung

Die Filter wurden mit 6 x SSC befeuchtet (damit die Membranen nicht brachen) und einzeln ausgestanzt.
Dann wurden sie in Denhardt Vorhybridisierungsmix (0,02% BSA, 0,02% Polyvinylpyrrolidon, 0,02% Ficoll 400 in 2 x SSC) 2 h lang bei 38 °C vorinkubiert. Von jeder DNA-Probe wurden 5 Filter in 2,5 ml Mix inkubiert. Danach wurden die Nitrocellulosefilter auf Filterpapier trokkengetupft.
Die 5 Filter einer Probe wurden in 0,5 ml 2,2 x SSC mit 50 µl der ^3H-markierten DNA bei 38 °C über Nacht inkubiert.
Danach wurden die Filter entnommen und einzeln im LSC gezählt. Die Auswertung erfolgte wie in 2.10.6.1.

3. ERGEBNISSE

3.1. VERWERTUNG VON KOHLENSTOFFQUELLEN

3.1.1. Die Vorversuche zur Medienherstellung

Es wurden die Stämme ATCC 27009, GD3B und SCH getestet. Es stellte sich heraus, daß beide Indikatoren Bromkresolgrün und Bromphenolblau in den getesteten Konzentrationen das Wachstum nicht beeinflußten.
BERKELEY et al. (1984) hatten berichtet, daß die Medienbestandteile Trypton und Pepton bei ihren Tests bei einigen Stämmen dazu geeignet waren, die Säureproduktion zu maskieren. Diese Stämme konnten die im Medium enthaltenen Aminosäuren verwerten, und gaben dabei Ammonium ins Medium ab. Die hierdurch bewirkte Alkalisierung des Mediums verhinderte, daß der Indikatorumschlag durch eine eventuell stattfindende Säureproduktion beobachtet werden konnte.
Die w-C.hex. Fs haltigen Stämme zeigen keine Abhängigkeit von Vitaminen oder ähnlichen zusätzlichen Wachstumsfaktoren (DARLAND und BROCK, 1971, DEINHARD, 1983). Allerdings war bekannt, daß bei den w-C.hept. Fs haltigen Stämme eine strikte Wachstumsabhängigkeit von Hefeextrakt besteht (KRISCHKE, 1982). Deswegen wurden 0,5 g Hefeextrakt/l Testmedium eingesetzt, um den w-C.hept. Fs haltigen Stämmen Wachstum zu ermöglichen, aber eventuelle Alkalisierung so gering wie möglich zu halten.
Bei ersten Versuchen, das Testmedium im API-CH50-System anzuwenden, stellte sich heraus, daß die w-C.hex. Fs haltigen Stämme sowohl mit Bromphenolblau als auch mit Bromkresolgrün bei einem Ausgangs-pH von 4 reproduzierbar deutlich sichtbare Säurebildung zeigten. Beim w-C.hept. Fs haltigen Stamm konnte mit Bromphenolblau und pH 4 nur eine undeutliche Aufhellung des Mediums festgestellt werden. Mit Bromkresolgrün war der Farbumschlag bei einem Ausgangs-pH von 4 geringfügig deutlicher. Daraufhin wurde für die w-C.hept. Fs haltigen Stämme das Medium mit einem pH von 4,3 und Bromkresolgrün eingesetzt. Hiermit konnte die Säurebildung gut verfolgt werden.
Die w-C.hex. Fs haltigen Stämme zeigten mit beiden Medien gleiche Ergebnisse.

3.1.2. Beobachtungen zum zeitlichen Verlauf der Säurebildung

In Tabelle 3 ist der zeitliche Verlauf der Säurebildung, wie er typischerweise bei den drei Stammgruppen zu beobachten ist, am Beispiel der Stämme ATCC 27009, GD3B und SCH gezeigt. Die Stärke der Säurebildung ist wie in 2.7.3. beschrieben codiert.
Die im API-CH50-Test enthaltenen C-Quellen, mit denen es bei diesen Stämmen zu keiner Säurebildung kam, sind in Tabelle 3 nicht enthalten.
Wie aus Tabelle 3 ersichtlich konnte bei den B. acidocaldarius Stämmen festgestellt werden, daß die Säurebildung in den meisten Fällen sehr stark war, und, wenn sie einmal eingesetzt hatte, durch den ganzen Versuchsverlauf beobachtet werden konnte. Bei den w-C.hex. Fs haltigen Isolaten setzte die Säurebildung im allgemeinen etwas später ein, und stieg dann eher kontinuierlich. Bei den w-C.hept. Fs haltigen Stämmen wurde insgesamt schwächere Säurebildung beobachtet. Hier konnte auch verstärkt eine rückläufige Indikatorreaktion festgestellt werden. Diese rückläufige Reaktion läßt sich mit den oben erwähnten Beobachtungen von BERKELEY et al. (1984) begründen. Offensichtlich benutzen diese Stämme die im Hefeextrakt enthaltenen Aminosäuren, setzen dabei Ammonium frei, und alkalisieren so das Medium.
Bei einigen C-Quellen konnte dieser Effekt auch bei den w-C.hex. Fs haltigen Isolaten beobachtet werden, allerdings nicht so ausgeprägt wie bei den w-C.hept. Fs haltigen Stämmen.

Tabelle 3: Zeitlicher Verlauf der Säurebildung im API-CH50-System bei den Stämmen ATCC 27009, GD3B und SCH. Die Stärke der Säurebildung ist codiert, wie in 2.7.3. angegeben. (ohne Symbol = keine Säurebildung)

Stammm	ATCC 27009	GD3B	SCH
Testtag	1 2 3 4 5 6	1 2 3 4 5 6	1 2 3 4 5 6
C-Quelle			
Glycerin	3 3 3 3 3	1 2 3 3 2 2	
Erythritol		1 2 3 3 3 3	
L-Arabinose	3 3 3 3 3 3	1 3 3 3 3 3	
Ribose	2 3 3 3 3 3	1 3 3 3 3 3	1 1 1 1 1 1
D-Xylose	1 3 3 3 3	1 3 3 3 3 3	1 1 1 1 1 1

Fortsetzung **Tabelle 3:**

Stammm	ATCC 27009						GD3B						SCH					
Testtag	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
C-Quelle																		
Adonitol											2	2						
Galaktose	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3	3			1			
D-Glucose	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3	3	1	1	1			
D-Fructose	3	3	3	3	3	3		3	3	3	3	3	1	1	2	1	1	
D-Mannose	3	3	3	3	3	3		2	3	3	3	3			1			
Rhamnose	2	2	2	2	2	2		2	3	3	2	2	1	1	1	1	1	2
Inositol							1	2	3	3	3	3						
Mannitol	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3	3	1	2	2	1	1	1
Sorbitol								2	3	3	3	3	1	1	1			
α-Methyl-D-glucosid									2	2	3	2						
Amygdalin						2			2	1							1	1
Arbutin						2			2	2	2	2						
Esculin	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		3	3	3	3	3
Salicin						2			2	2	2	2						
Cellobiose	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3	3						
Maltose		3	3	3	3	3			2	2	3	3						
Lactose		3	3	3	3	3			2	2	3	3						
Melibiose		3	3	3	3	3												
Saccharose		3	3	3	3	3												
Trehalose		3	3	3	3	3												
D-Raffinose		2	3	3	3	3												
Stärke				1	2	2												
Glycogen		3	3	3	3	3												
Xylitol							1	3	3	3	3	3						
ß-Gentiobiose				2	2	2			2	2	3	3						
L-Fucose													1					
D-Arabitol											3	2						
5-Keto-Gluconat														?				

3.1.3. Die drei Gruppen von Stämmen im API-CH50-Test

Tabelle 4 zeigt, wieviele Stämme der drei Organismengruppen die jeweiligen C-Quellen verwerten konnten.
Alle Stämme konnten D-Xylose, Galaktose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose und Mannitol zur Säurebildung verwerten, sowie Esculin hydrolysieren.
Keiner der getesteten Stämme konnte mit den folgenden C-Quellen Säure produzieren: L-Xylose, ß-Methyl-xylosid, L-Sorbose, Dulcitol, α-Methyl-D-mannosid, N-Acetyl-glucosamin, Inulin, D-Tagatose, D-Fucose, L-Arabitol, Gluconat, 2-Keto-Gluconat.

3.1.3.1. B. acidocaldarius

11 der im API-CH50-System enthaltenen C-Quellen waren auch schon von DARLAND und BROCK (1971) in ihrer Erstbeschreibung von B. acidocaldarius getestet worden. DARLAND und BROCK testeten allerdings das Wachstum mit den entsprechenden C-Quellen, und nicht die Säurebildung.
Dabei stimmen die Ergebnisse für Glycerin, Galaktose, D-Glucose mit den im API-CH50-System erhaltenen überein, sämtliche getesteten Stämme konnten die drei C-Quellen verwerten. Auch bei Sorbit zeigte sich in beiden Tests das gleiche Ergebnis, keiner der Stämme konnte es verwerten.
Im API-Test waren alle Stämme Gluconat negativ, während DARLAND und BROCK nur DSM 455 negativ fanden. Bei den weiteren C-Quellen gab es Abweichungen. Im Folgenden werden die C-Quellen mit den Stämmen und dem API-Test Ergebnis, welches sich von dem von DARLAND und BROCK unterscheidet, genannt:

Ribose: DSM 454 +
Rhamnose: DSM 453 +
Inositol: ATCC 27009 -, DSM 454 -
Lactose: DSM 451 +, DSM 452 +, DSM 453 +, DSM 454 +, DSM 455 +
Stärke: DSM 452 -, DSM 455 -.

Tabelle 4: Anzahl der Stämme der drei Organismengruppen, die mit den verschiedenen C-Quellen Säurebildung zeigen. Die Gesamtzahl der Stämme war: 8 B. acidocaldarius-Stämme (B. a.), 13 w-C.hex. Fs haltigen Isolate (B. at) und 15 w-C.hept. Fs haltigen Isolate (B. cy.).

C-Quelle	B.a.	B.at.	B.cy.
Glycerin	8	13	0
Erythritol	0	13	0
D-Arabinose	0	0	1
L-Arabinose	8	13	0
Ribose	5	13	11
Adonitol	0	7	0
Rhamnose	4	13	13
Inositol	3	6	12
Sorbitol	0	12	14
α-Methyl-D-glucosid	4	12	0
Amygdalin	0	4	1
Arbutin	8	10	0
Salicin	7	12	0
Cellobiose	8	13	0
Maltose	8	12	0
Lactose	6	11	0
Melibiose	5	0	0
Saccharose	8	3	0
Trehalose	8	4	0
Melezitose	5	1	0
D-Raffinose	7	1	0
Stärke	6	2	0
Glycogen	8	2	0
Xylitol	0	12	0
ß-Gentiobiose	8	12	0
D-Turanose	7	2	0
D-Lyxose	0	0	1
L-Fucose	0	0	13
D-Arabitol	0	8	1
5-Keto-Gluconat	0	0	13

Die Abweichungen lassen sich zum einen mit den unterschiedlichen Temperaturbedingungen erklären: DARLAND und BROCK (1971) inkubierten bei 56 °C, während der API-Test bei 50 °C durchgeführt wurde. Außerdem inkubierten DARLAND und BROCK nur 4 Tage lang. Der API-Test dauerte 6 Tage. Dabei konnte die Säurebildung aus Laktose bei den oben genannten Stämmen erst ab dem dritten, vierten oder sogar fünften Tag beobachtet werden.
Die Testresultate sämtlicher Stämme und C-Quellen im einzelnen sind in Tabelle 5 enthalten.

3.1.3.2. Die w-C.hex. Fs haltigen Isolate

Im Vergleich mit den B. acidocaldarius Stämmen konnte man in der Verwertung der C-Quellen durch die w-C.hex. Fs haltigen Isolate einige Unterschiede feststellen.
Die Di- und Polysaccharide wurden von den w-C.hex. Fs haltigen Isolaten im allgemeinen schlechter verwertet, als von den B. acidocaldarius Stämmen. Hierbei sind die herausragendsten Beispiele Saccharose, Trehalose und Glycogen, welche von allen B. a. Stämmen verwertet wurden, während bei den w-C.hex. Fs haltigen Isolaten nur 3, 4, und 2 (von insgesamt 13 Stämmen) die entsprechenden C-Quellen verwerten konnten. Fast genauso deutlich zeigte sich diese Tendenz auch bei Melibiose (5 B.a. positiv, 0 Isolate) und bei den Trisacchariden Melezitose und D-Raffinose (5 bzw. 7 B.a. positiv, je 1 w-C.hex. Fs haltiges Isolat positiv).
Betrachtet man die Verwertung von Alkoholen als C-Quelle zeigt sich eine umgekehrte Tendenz. Alle B.a. Stämme konnten zwar, wie die w-C.hex. Fs haltigen Isolate Mannitol verwerten. Keiner der B.a. Stämme konnte aber aus Erythritol, Adonitol, Sorbitol, Xylitol und D-Arabitol Säure bilden; bei den w-C.hex. Fs haltigen Isolaten waren es 13, 7, 12, 12 und 8 von insgesamt 13 Stämmen. Von keinem der Stämme wurde Dulcit oder L-Arabitol verwertet.
Bei den weiteren C-Quellen ließen sich keine einheitlichen Charakteristika feststellen, die geeignet wären, die beiden Gruppen auf den ersten Blick zu unterscheiden (vergl. Tab. 4 und Tab. 5).

3.1.3.3. Die w-C.hept. Fs haltigen Isolate

Die w-C.hept. Fs haltigen Stämme zeigen zu den beiden oben besprochenen Gruppen große Unterschiede. Insgesamt gesehen ist ihr C-Quellen Spektrum sehr viel eingeschränkter. Andererseits sind die Ergebnisse für diese Stämme auch sehr viel einheitlicher. Di-, Tri- und Polysaccharide werden von keinem der w-C.hept. Fs haltigen Stämme verwertet. Im Gegensatz zu allen übrigen getesteten Stämmen können sie keine L-Arabinose verwerten. Auch bei α-Methyl-D-Glucosid, Arbutin und Salicin, welche die meisten übrigen Stämme verwerten können, zeigen die w-C.hept. Fs haltigen Stämme eine negative Reaktion. Mit Inositol und Sorbitol zeigen die meisten von ihnen wie die w-C.hex. Fs haltigen Isolate Säurebildung. Bei Xylitol und Adonitol dagegen zeigen sie wie die B.a. Stämme keine Reaktion.
Die beiden einzigen C-Quellen, mit welchen im Gegensatz zu den anderen beiden Gruppen fast alle w-C.hept. Fs haltigen Isolate Säure bilden könne, ist L-Fucose und 5-Keto-Gluconat. (vergl. Tabelle 4 und Tabelle 5).

Tabelle 5: Liste sämtlicher Ergebnisse des API-CH50-Tests. Die Nummern der C-Quellen entsprechen der Tabelle 2. Die C-Quellenverwertung ist codiert, wie in 2.7.3. angegeben. B.at. = w-C.hex Fs haltige Isolate, B. cy. = w-C.hept. Fs haltige Isolate

	1	2	3	4	
C-Quelle Nr	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	123456789
Stamm					
B.a.					
ATCC 27009	3003330003	3330200300	0002303333	3300323033	000000000
DSM 448	2003320003	3330000300	0001323300	3302323023	000000000
DSM 449	2003320003	3330000300	0001323300	3202223023	000000000
DSM 451	2003030003	3330003300	2002323323	3302323023	000000000
DSM 452	2003030003	3330003300	2002323333	3200203023	000000000
DSM 453	3003020003	3330200300	2002323333	3302323022	000000000
DSM 454	2003220002	3330200300	2002323333	3302223022	000000000
DSM 455	2003320003	3330202300	0002322220	2200002020	000000000

(Fortsetzung nächste Seite)

Fortsetzung Tab. 5:

	1	2	3	4	
C-Quelle Nr	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	123456789
Stamm					
B.at.					
DSM 2498	3303330303	3330300300	2022323200	0000000020	000020000
GD1B	3203230003	3330200320	2012323330	3302223222	000000000
GD2C	2203330003	3330300330	2002323330	0000000320	000000000
MD2A	3303330203	3330203330	2002323220	0200000320	000010000
GD3B	2303330203	3330203330	2022323330	0000000330	000030000
ND2B	2203330203	3330200330	2000323220	0000000320	000000000
E 1	2303330003	3330203330	2002323330	2200022322	000020000
GD1A	2203330002	3330200330	0000302000	0000000300	000000000
G 1	2303330303	3330203330	2002323330	0000000320	000020000
GK2B	2303330003	3330300330	2000323220	0000000320	000020000
MD3A	2303330203	3330303330	2002323330	0200000330	000020000
B 45	3303330003	3330300330	3022323330	2000020330	000000000
B 50	2303330203	3330202330	2002323230	0000000330	000020000
B.cy					
SCB	0000110001	1110200210	0010300000	0000000000	000100000
F 1	0000110001	0011121111	0000300000	0000000000	000000002
SAW 17	0000110001	1211211210	0000300000	0000000000	000000002
SAW 21	0000110001	1211211210	0000300000	0000000000	000000002
SAW 15	0000010001	1210210110	0000300000	0000000000	000020000
SGE 21	0000110001	1111211210	0000300000	0000000000	000000002
SKP 21	0000110001	1211211210	0000300000	0000000000	000000002
SWA 15	0000120001	1211211210	0000300000	0000000000	000000002
SAW 14	0000210001	1211211210	0000300000	0000000000	000000002
SWA 12	0000010001	1211211210	0000300000	0000000000	000000002
SGE 15	0010010001	1111211110	0000300000	0000000000	100100002
SKP 16	0000110001	1211201110	0000300000	0000000000	000100002
S 5	0000010001	1211211210	0000300000	0000000000	000000002
GPFLK	0000110001	1111211110	0000300000	0000000000	000000002
BGPFK	0000110001	1111200200	0000300000	0000000000	000100002

3.2. NUMERISCH TAXONOMISCHE AUSWERTUNG DER C-QUELLENVERWERTUNG

Die Ergebnisse aus dem API-CH50-Test wurden zur Verdeutlichung mit den Mitteln der Numerischen Taxonomie ausgewertet. Es sollte festgestellt werden, ob sich die drei verschiedenen thermophilen acidophilen Organismengruppen durch ihr C-Quellenverwertungsspektrum voneinander unterscheiden lassen.
Die Methode wurde zur Ergänzung der weiteren, nicht numerisch-taxonomisch ausgewerteten Identifizierungskriterien benutzt.
In der numerischen Taxonomie werden wenigstens 50, besser aber 100 bis 200 Eigenschaften benutzt (SOKAL und SNEATH, 1963, JONES und SACKIN, 1980). Hier wurden die 49 Einzelergebnisse aus dem API-Test ausgewertet. Dabei wurde meist eine Kombination von zwei Werten pro Testergebnis benutzt, nämlich die Reaktion selbst (Säurebildung oder keine Säurebildung mit einer bestimmten C-Quelle) sowie ein quantifizierter Wert (keine, leichte, deutliche, starke Säurebildung). Diese Codierung wurde gewählt, weil das benutzte Num.-Tax. Programm die Übereinstimmung von zwei Eigenschaften durch den Ähnlichkeitskoeffizienten S_{SM} (SOKAL und MICHENER, 1958) im Alles oder Nichts-Prinzip, und nicht graduelle Übereinstimmung feststellt. BOEYE und AERTS (1976) waren bei der Numerisch Taxonomischen Beschreibung ihrer Bacillus Isolate ähnlich vorgegangen. Da das eine der Charakteristika vom anderen abhängt, könnte man sie auch als eine 'multi-state' Eigenschaft betrachten. Andererseits sollte man in Betracht ziehen, daß in der Numerischen Taxonomie auch z.B. morphologische Eigenschaften, die voneinander abhängig sind, wie Sporenbildung und Form der Sporen und Sporangien (u.a. PRIEST et al., 1981, GARCIA et al. 1982, PICHINOTY et al., 1980) als mehrere 'two-state' Eigenschaften bewertet werden.

3.2.1. Clusteranalyse aller Organismengruppen

Die Single Linkage Methode (SNEATH, 1957) ist zwar die einfachste Cluster-Analysenmethode, aber sie hat bedeutende Einschränkungen. Bei der Gruppierung wird der neu hinzukommende Stamm demjenigen schon in der Gruppe vorhandenen Stamm zugeordnet, der diesem am ähnlichsten ist. Dies kann in bestimmten Fällen zu Analyseergebnissen führen, die die tatsächliche Ähnlichkeit der Stämme untereinander verzerrt wieder-

Abb. 2: Dendrogramm bei welchem die Average Linkage Clusteranalyse auf alle Stämme mit sämtlichen Ergebnissen des API-CH50-Tests angewandt wurde.

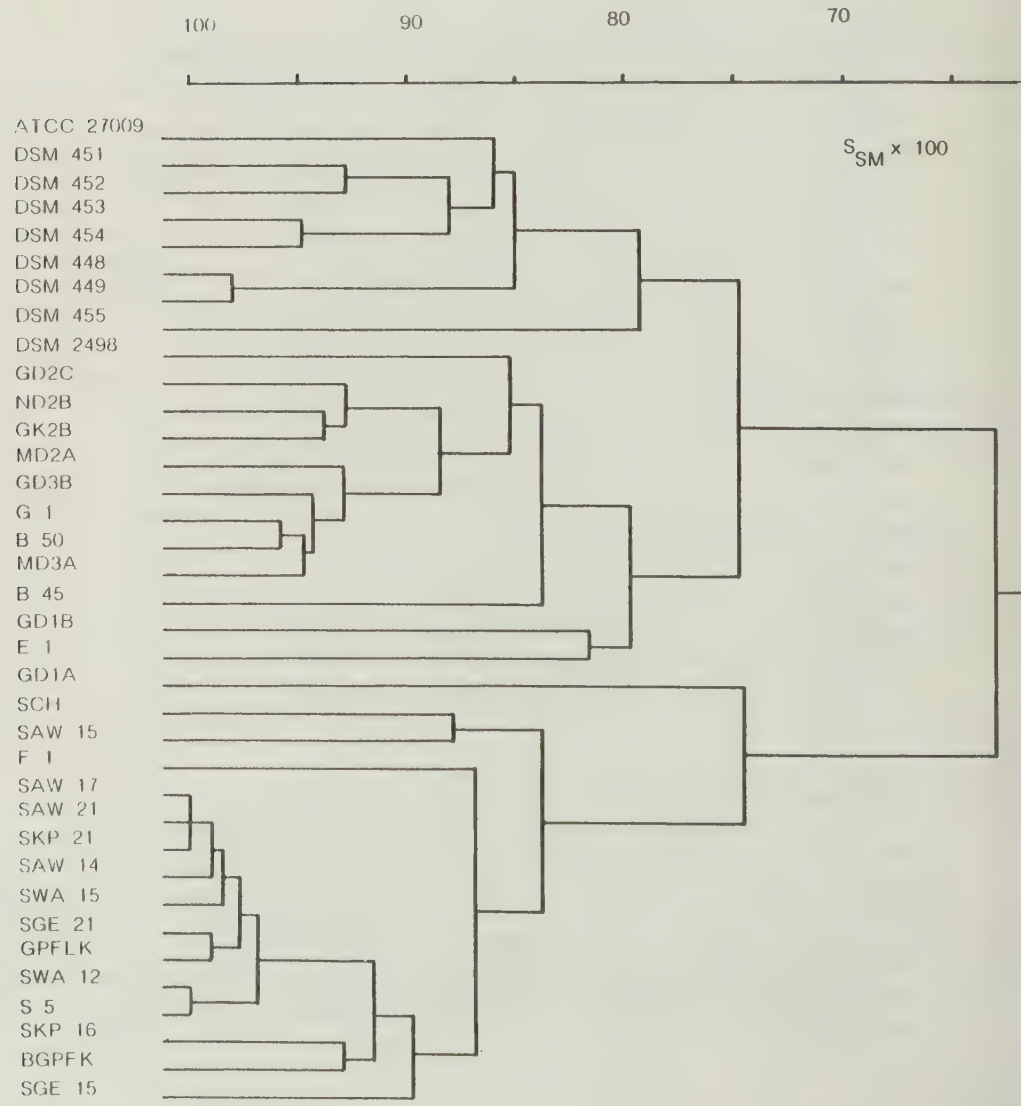
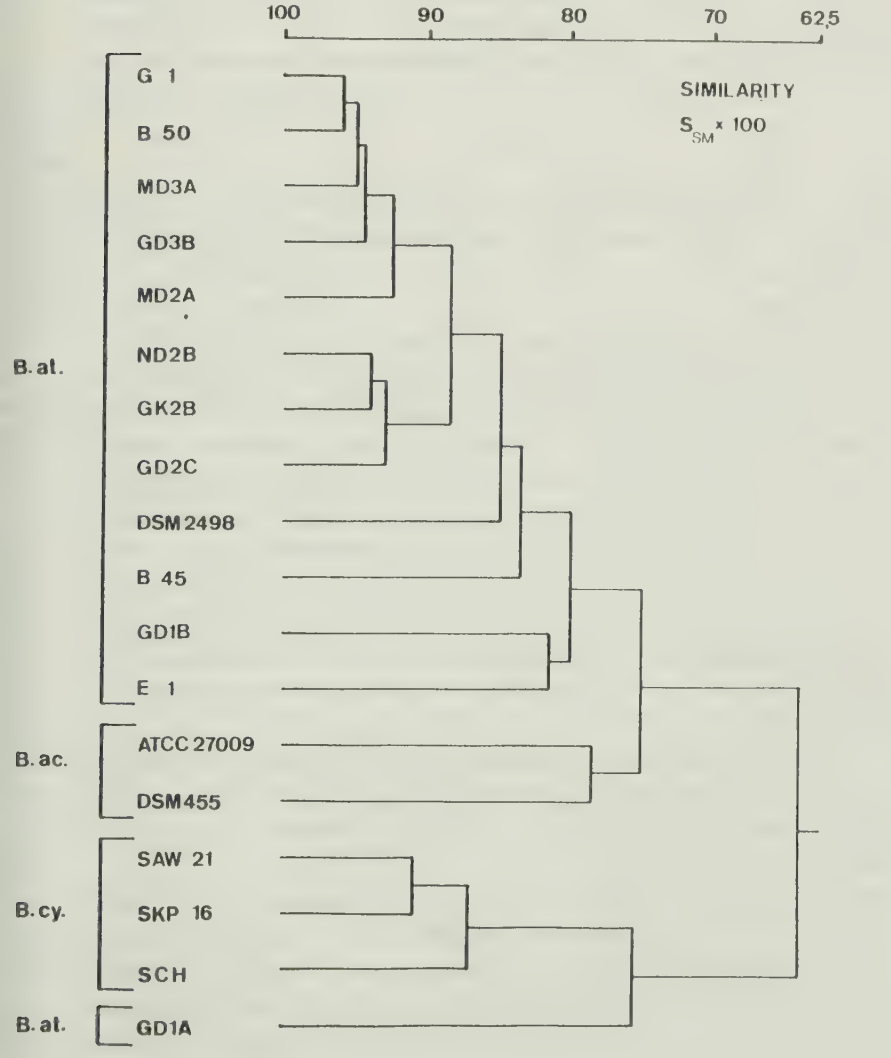


Abb. 3: Dendrogramm bei dem die Average Linkage Clusteranalyse auf die qualitativen und quantitativen Ergebnisse des API-CH50-Tests der w-C.hex. Fs haltigen Isolate und einige Vergleichsorganismen angewandt wurde. (B. at. = w-C.hex. Fs haltige Isolate, B. a. = Bacillus acidocaldarius, B. cy = w-C.hept. Fs haltige Stämme) (entnommen aus DEINHARD et al., 1987b)



geben. Dabei können zwei relativ weit voneinander entfernte Gruppen durch einen einzigen Mitgliedern beider Gruppen ähnlichen Stamm zu einer Gruppe zusammengeführt werden, ohne daß die übrigen Gruppenmitglieder untereinander tatsächlich so ähnlich sind, wie es im Dendrogramm dann erscheint (SOKAL und SNEATH, 1963).
Um dieser Fehlerquelle zu begegnen wurde in den nachfolgenden Analysen die Average Linkage Clusteranalysemethode nach SOKAL und MICHENER (1958) benutzt. In dieser Methode werden zum Cluster neuhinzukommende Stämme mit den Eigenschaften der gesamten bestehenden Gruppe verglichen. Dadurch können die bei der Single Linkage Methode auftretenden 'falschen' Cluster vermieden werden.

In Abb. 2 ist das Dendrogramm gezeigt, welches sich ergibt, wenn die Stämme mit den 49 Eigenschaften aus dem API-Test mit ihrem quantifizierten Wert zusammen über die Average Linkage Clustermethode analysiert werden.
Eine deutliche Trennung zwischen den Gruppen der w-C.hex. Fs haltigen und der Gruppe der w-C.hept. Fs haltigen Stämme ist sichtbar (Ausnahme ist der Stamm GD1A, der in die Gruppe der w-C.hept. Fs haltigen Stämme fällt, s.u.). Auch die w-C.hex. Fs haltigen Stämme teilen sich wieder in zwei Gruppen, von denen die eine alle B. acidocaldarius Stämme enthält, die andere alle w-C.hex. Fs haltigen Isolate mit oben genannter Ausnahme. In Abb. 3 (entnommen aus DEINHARD et al., 1987a) wurde die gleiche Analysemethode auf die w-C.hex. Fs haltigen Isolate mit einigen Vergleichsorganismen angewandt. Auch hier läßt sich die deutliche Abtrennung des Stammes GD1A von den übrigen w-C.hex. Fs haltigen Stämmen und seine größere Ähnlichkeit mit den w-C.hept. Fs haltigen Stämmen feststellen.
Da die Zugehörigkeit des Stamms GD1A zu den w-C.hex. Fs haltigen Isolaten auf Grund anderer Untersuchungsergebnisse (HIPPCHEN et al., 1981, DEINHARD 1983) erwiesen war, wurde das Ergebnis der Cluster-Analyse weiter untersucht.
Abb. 4 zeigt das Dendrogramm, welches ensteht, wenn man nur die Eigenschaften in die Clusteranalyse miteinbezieht, bei denen wenigstens einer der Stämme ein positives Ergebnis zeigte. Damit wird verhindert, daß nicht vorhandene Eigenschaften in die Analyse miteingehen, und so eine größere Ähnlichkeit der Stämme untereinander vorgetäuscht

Abb. 4: Dendrogramm bei welchem die Average Linkage Clusteranalyse auf alle Stämme mit den Ergebnissen des API-CH50-Tests angewandt wurde, bei denen wenigstens einer der Stämme ein positives Ergebnis zeigte. (Erläuterungen im Text)

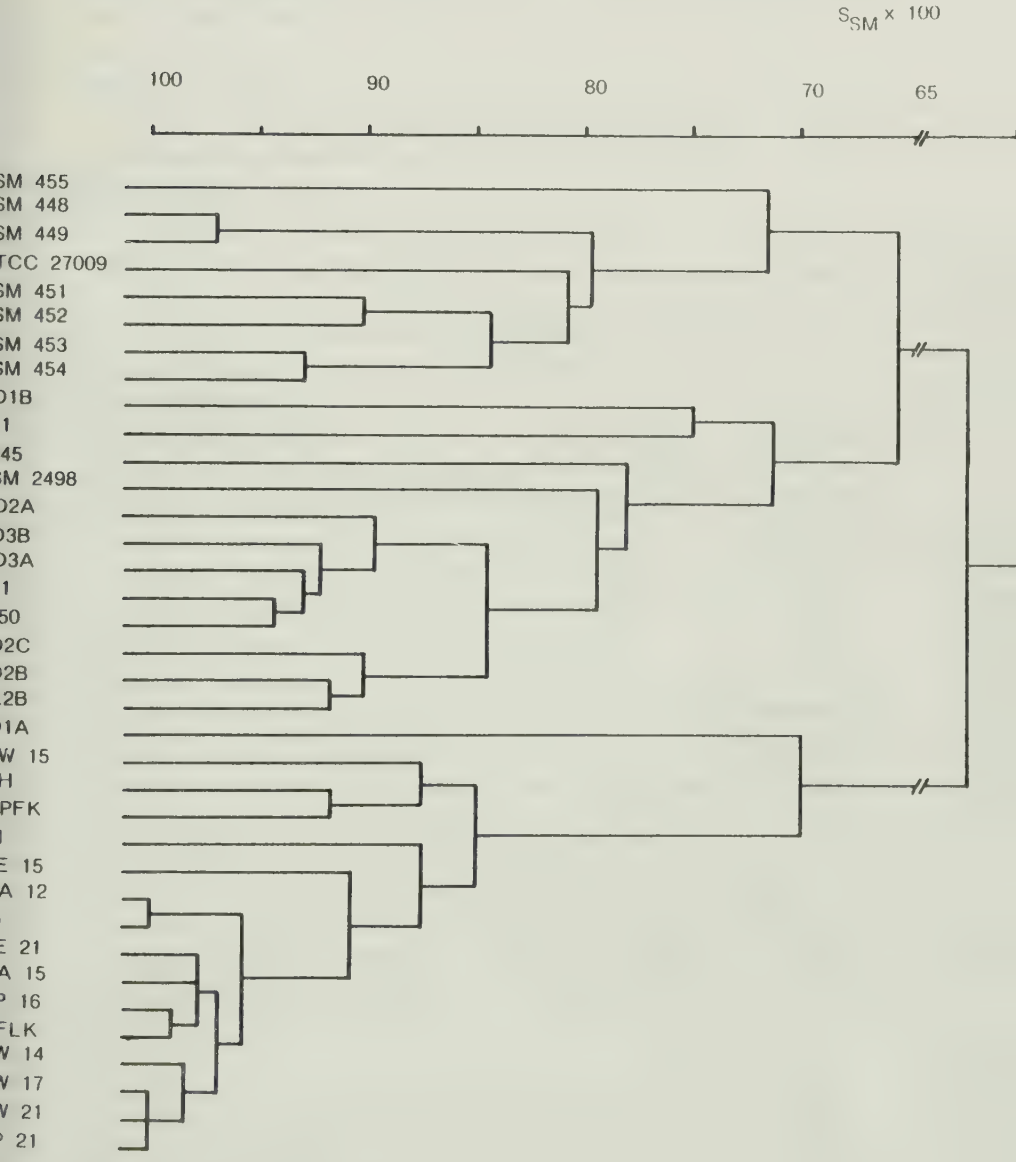
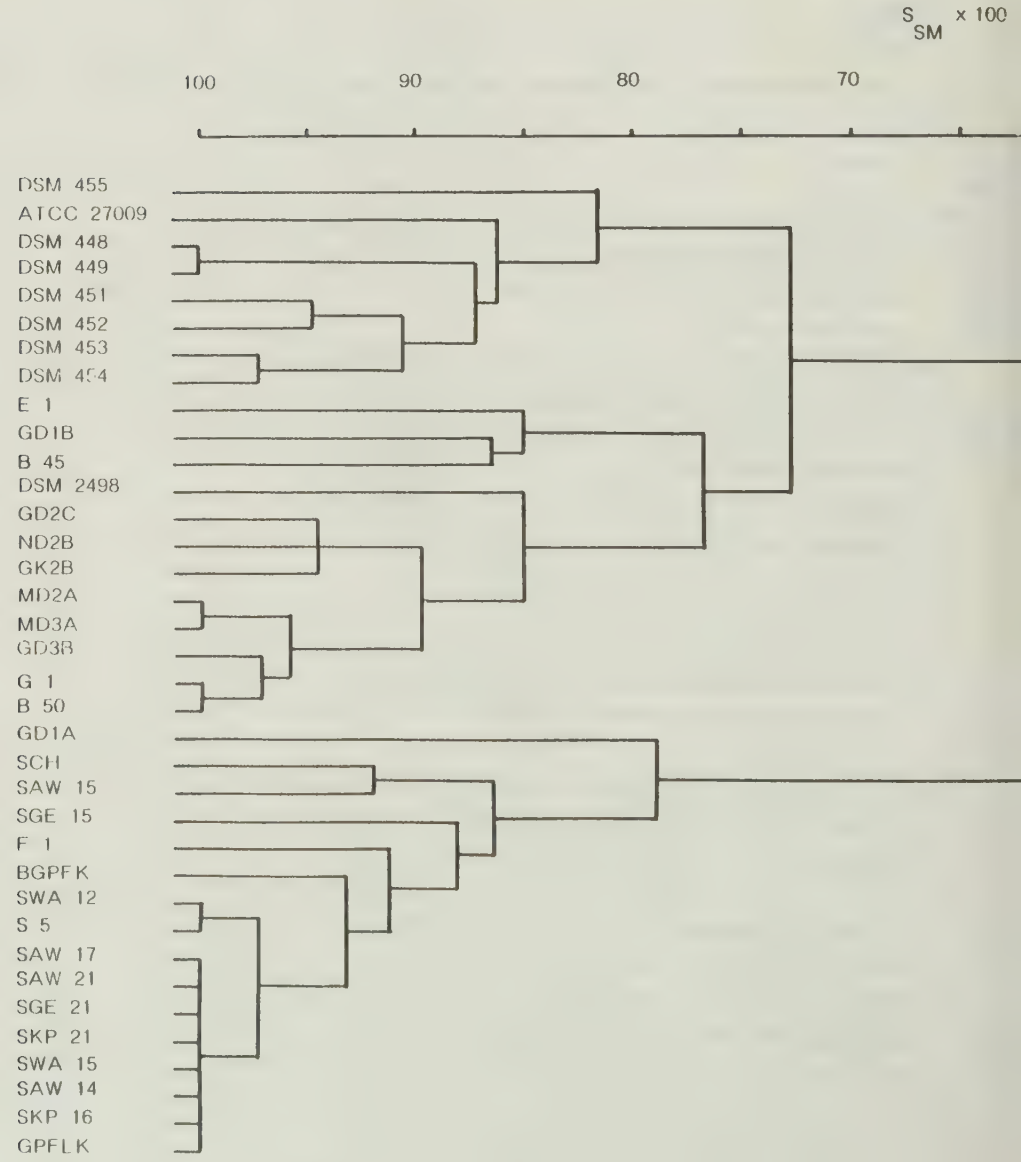


Abb. 5: Dendrogramm bei dem die Average Linkage Clusteranalyse auf alle Stämme angewandt wurde. Es wurden nur die Tests einbezogen, bei denen wenigstens einer der Stämme ein positives Ergebnis zeigte. Die Ergebnisse zur Quantität der Säurebildung wurden weggelassen. (Erläuterungen im Text).



wird (SOKAL und SNEATH, 1963). Da das Ziel der Analyse war, die Ähnlichkeit der getesteten Gruppen bezüglich ihrer C-Quellenverwertung zu verdeutlichen, wurden aber die bei allen Stämmen übereinstimmenden positiven Werte in der Analyse belassen. Auch in diesem Dendrogramm zeigt sich eine größere Ähnlichkeit des Stammes GD1A mit den w-C.hept. Fs haltigen Stämmen.
Das in Abb. 5 gezeigte Dendrogramm beruht auf den nicht quantifizierten Testergebnissen (Säurebildung positiv oder negativ). Wie vorauszusehen war, vergrößert sich die Ähnlichkeit der Gruppen untereinander. Innerhalb der einzelnen Gruppen wird die Differenzierung der Stämme hier weniger deutlich.

3.2.2. Clusteranalyse der Isolategruppen

Um die Stellung des Stammes GD1A genauer zu untersuchen, wurde die Clusteranalyse zum einen auf die w-C.hept. Fs haltigen Stämme und GD1A beschränkt.
Hierbei wurden nur die Tests in die Analyse genommen, bei denen wenigstens einer der Stämme positiv reagierte (vergl. oben). Außerdem wurden die quantifizierten Eigenschaften mitberücksichtigt (Abb. 6) Es stellte sich heraus, daß GD1A mit den w-C.hept. Fs haltigen Stämmen auf einem Ähnlichkeitslevel von 46,2 clusterte. Die w-C.hept. Fs haltigen Stämme zeigen ein homogenes Cluster mit einem minimalen Ähnlichkeitslevel von 75,3.
Unterzieht man die w-C.hex. Fs haltigen Isolate der gleichen Prozedur (natürlich nach Auswahl der diesen Stämmen entsprechenden Tests) zeigt sich, daß GD1A auf dem Ähnlichkeitslevel 58,4 mit diesen Stämmen clustert. Im Übrigen zeigen die w-C.hex. Fs haltigen Stämme untereinander eine größere Heterogenität als die w-C.hept. Fs haltigen Stämme (Abb. 7).
Da die Average Linkage Clusteranalyse, wie oben schon erläutert, jeden zu einem bestehenden Cluster zuzufügenden Organismus mit sämtlichen bereits im Cluster vorhandenen Organismen verrechnet, kommt es also im Falle des Stammes GD1A zu einer 'falschen' Clusterzuordnung. Führt man

Abb. 6: Dendrogramm bei dem Average Linkage Clusteranalyse auf die w-C.hex. Fs haltigen Isolate angewandt wurde. Es wurden nur die Tests miteinbezogen, bei denen wenigstens einer der Stämme ein positives Ergebnis zeigte.

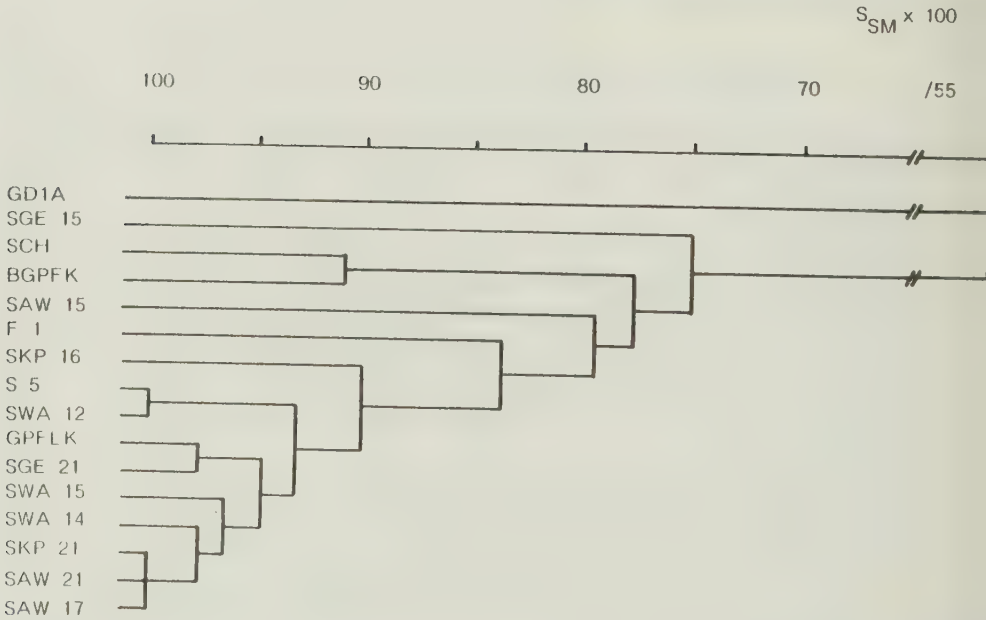
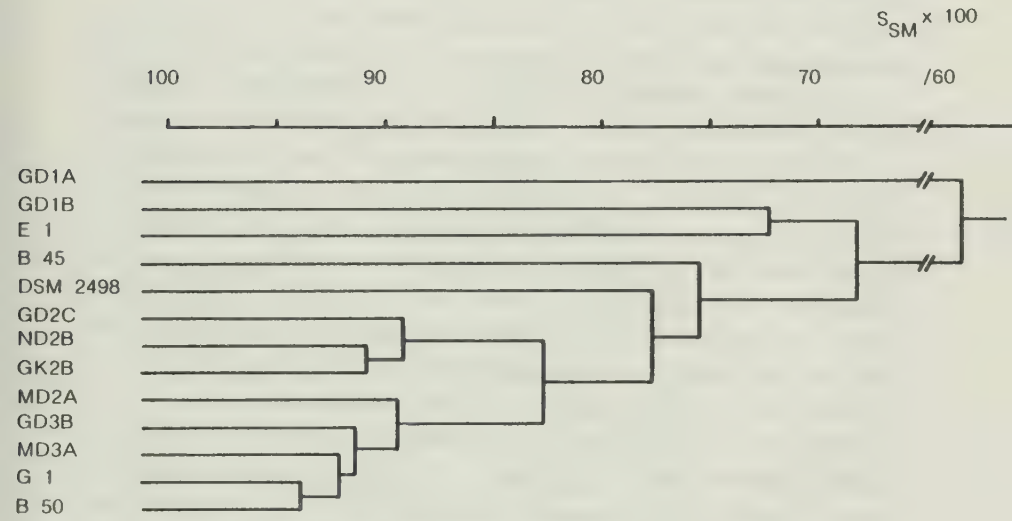


Abb. 7: Dendrogramm bei dem Average Linkage Clusteranalyse auf die w-C.hept. Fs haltigen Stämme angewandt wurde. Es wurden nur Tests mit-einbezogen, bei denen wenigstens einer der Stämme ein positives Ergeb-nis zeigte.

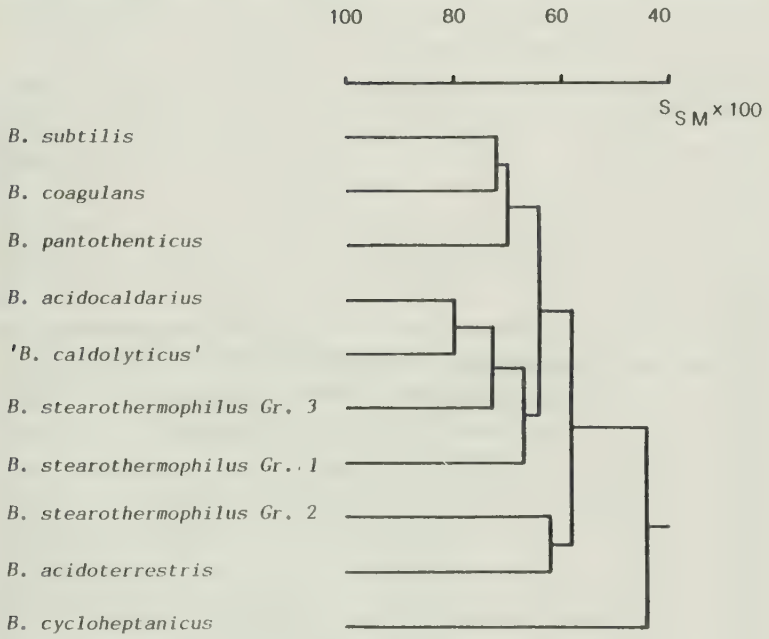


in diesem Falle eine Single Linkage Analyse aus, so clustert GD1A mit den anderen w-C.hex. Fs haltigen Stämmen.
Abgesehen von GD1A ist allerdings die Average Linkage Clustermethode auf Grund der oben vermerkten Kriterien vorzuziehen.

3.2.3. Vergleich der thermoacidophilen Gruppen mit bereits bekannten Bacillus-Arten

In Abb. 8 ist ein Dendrogramm der drei hier bearbeiteten Organismengruppen und weiterer Bacillus Arten dargestellt.
Die einzelnen Äste stellen jeweils eine Gruppe bzw. Art dar. Für B. stearothermophilus wurden die Stammgruppen von WALKER und WOLF (1971) wie sie LOGAN und BERKELEY (1984) in ihren API-CH50-Tests gruppiert hatten, übernommen. Dem hier gezeigten Dendrogramm liegen die Werte, die BERKELEY et al. (1984) in ihrer Studie mit dem API-CH50-System darstellten zugrunde. Die einzelnen Eigenschaften wurden für diese Auswertung codiert wie folgt: war wenigstens einer der getesteten Stämme einer Art positiv, d.h. konnte die entsprechende C-Quelle verwerten, so wurde wie oben 'Verwertung 1' im Gegensatz zu 0 eingesetzt. Als weiteres Kriterium wurde die prozentuale Anzahl der Stämme einer Art die diese C-Quelle verwerten konnten, miteingesetzt. Bis zu 34% wurde mit 1 codiert, bis 67% mit 2 und bis 100% mit 3.
Im Dendrogramm Abb. 6 wurden die thermophilen Bacillus-Arten mit den thermoacidophilen Arten, die hier beschrieben werden, verglichen. Außerdem wurde auch B. coagulans, der mäßig thermo- und acidophil ist und B. subtilis als Vertreter der mesophilen Bacilli miteinbezogen. B. pantothenticus wurde berücksichtigt, weil die w-C.hept. Fs haltigen Isolate ebenfalls stark Pantothenat abhängig sind.
Interessant ist die Clusterbildung der mesophilen Arten. Die thermophilen bzw. thermoacidophilen Arten zeigen folgende Verteilung: B.a. clustert mit 'B. caldolyticus' und B. stearothermophilus Gr.3 und Gr.1, während die w-C.hex. Fs haltigen Isolate (B. acidoterrestris) mit B. stearothermophilus Gr.2, allerdings auf ziemlich niedrigem Level clustert. Die w-C.hept. Fs haltigen Stämme (B. cycloheptanicus) zeigen die geringste Ähnlichkeit mit den übrigen Gruppen.

Abb. 8: Dendrogramm auf der Basis der API-CH50-Ergebnisse von LOGAN und BERKELEY (1984) und den hier erzielten Ergebnissen für die acidothermophilen Gruppen. (Erläuterungen im Text)

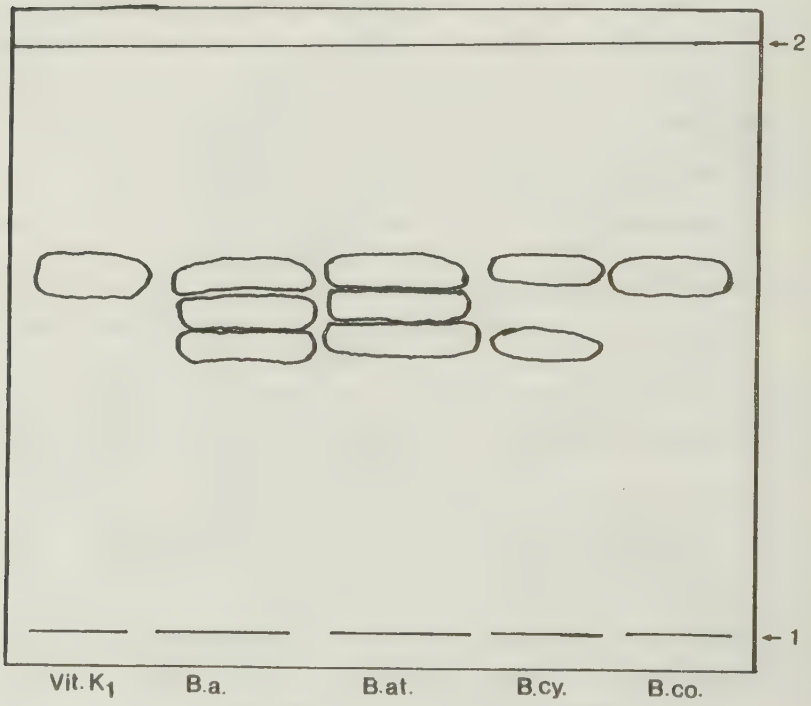


3.3. ERGEBNISSE DER MENACHINONANALYSEN

3.3.1. Präparative Dünnschichtchromatographie der Menachinonextrakte

In Abb. 9 ist eine typische präparative DC der MK-Extrakte der w-alicyclische Fs haltigen Stammgruppen gezeigt. Die Detektion der Flekken erfolgte unter UV-Licht. Vitamin K_1 ist in dieser DC als Vergleichssubstanz eingesetzt.

Abb. 9: Präparative DC der Menachinonrohextrakte. 1 = Auftragsstelle, 2 = Laufmittelfront, Vit K_1 = Vitamin K_1, B.a. = ATCC 27009, B.at. = GD3B, B.cy. = SCH, B.co. = ATCC 7050



Nach KROPPENSTEDT (1982) hat Vitamin K_1 bei dieser Trennmethode den gleichen R_f wie die extrahierten Menachinone. Die Flecken mit dem gleichen R_f-Wert wurden für die Menachinonanalyse weiterverwendet.
Im Gegensatz zu KROPPENSTEDT (1982) konnte bei dieser Methode nicht nur der eine Fleck mit dem R_f-Wert, der die Menachinone repräsentiert, nachgewiesen werden. Bei den w-C.hex. Fs haltigen Stämmen treten zwei weitere Flecken mit einem kleineren R_f-Wert auf. Die w-C.hept. Fs haltigen Stämme zeigen einen weiteren Fleck der das gleiche Laufverhalten wie der dritte Fleck der w-C.hex. Fs haltigen Stämme zeigt.

Tabelle 6: R_f-Werte der Flecken auf der präparativen DC bei ausgewählten Stämmen.

Fleck Nr.	1	2	3
Stamm			
B.a.			
ATCC 27009	0,7	0,64	0,53
DSM 448	0,7	0,64	0,53
DSM 453	0,69	0,62	0,55
w-C.hex.Fs haltige			
GD3B	0,7	0,64	0,53
MD3A	0,7	0,64	0,53
GD1B	0,7	0,62	0,57
GD1A	0,7	0,62	0,57
B 50	0,7	0,62	0,57
B 45	0,7	0,64	0,53
w.C.hept.Fs haltige			
SCH	0,7		0,57
GPFLK	0,69		0,55
F 1	0,7		0,53
B. subtilis			
DSM 10	0,7		
B. co.			
ATCC 7050	0,69		
Vitamin K_1	0,7		

3.3.2. UV-Spektren der auf der präparativen Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Substanzen

Bei den folgenden UV-Spektren wurden die Substanzen in Isopropanol gemessen.

In Abb. 10 sind die UV-Spektren der mittels präparativer DC aufgetrennten Substanzen aus dem Extrakt des Stammes ATCC 27009 gezeigt. a) ist das Spektrum des Flecks 1 (R_f 0,7). Dieses Spektrum zeigt die typischen Merkmale der Menachinone mit Absorptionsmaxima bei 242, 248, 260, 269 und 326 nm und einer Schulter bei 238 nm (COLLINS und JONES, 1981, COLLINS, 1985).

b) ist das Spektrum des Flecks 2 (R_f 0,64). Die enthaltene Substanzmenge ist deutlich geringer. Es lassen sich keine deutlichen Maxima bei den menachinontypischen Wellenlängen feststellen. Auch Fleck 3 (R_f 0,53, c) zeigt die menachinontypischen Eigenschaften im UV-Spektrum nicht.

Die Substanzen der w-C.hex. Fs haltigen Isolate zeigten die gleichen Spektren wie die der B.a. Stämme.

In Abb. 11 sind die Spektren der beiden Substanzen, die bei den w-C.hept. Fs haltigen Stämmen aufgetrennt wurden am Beispiel des Stamms SCH gezeigt.

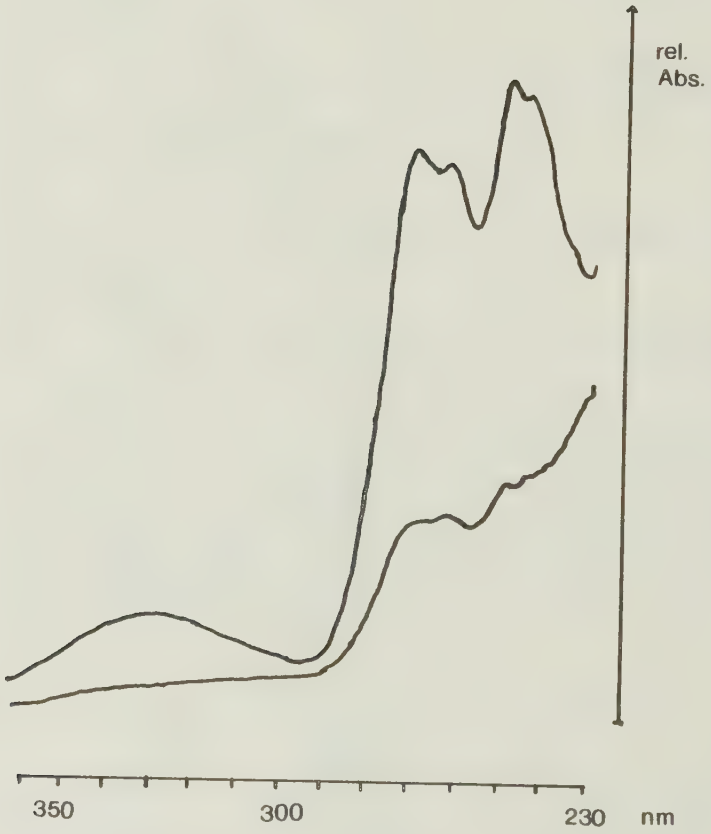
Der Substanz mit R_f-Wert 0,7 zeigt das typische Menachinonspektrum, während die Substanz mit R_f 0,57 ein abweichendes Spektrum zeigt.

Die angewandte Extraktionsmethode für Menachinone resultiert in einer komplexen Mischung verschiedener Lipide (COLLINS und JONES, 1981).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden zur Menachinonanalyse nur die Substanzen mit dem gleichen R_f-Wert wie Vitamin K_1 weiterbearbeitet.

Abb. 10: UV-Spektrum der drei Flecken der präparativen DC der Menachinonextrakte von B.a. ATCC 27009. a = Spektrum der Substanz mit R_f 0,7, b = Spektrum der Substanz mit R_f 0,64, c = Spektrum der Substanz mit R_f 0,53.

Abb. 11: UV-Spektrum der zwei Flecken der präparativen DC der Menachinonextrakte des w-C.hept. Fs haltigen Stammes SCH. a = Spektrum der Substanz mit R_f 0,7, b_w = Spektrum der Substanz mit R_f 0,57.



3.3.3. Dünnschichtchromatographische Analyse der Menachinonextrakte

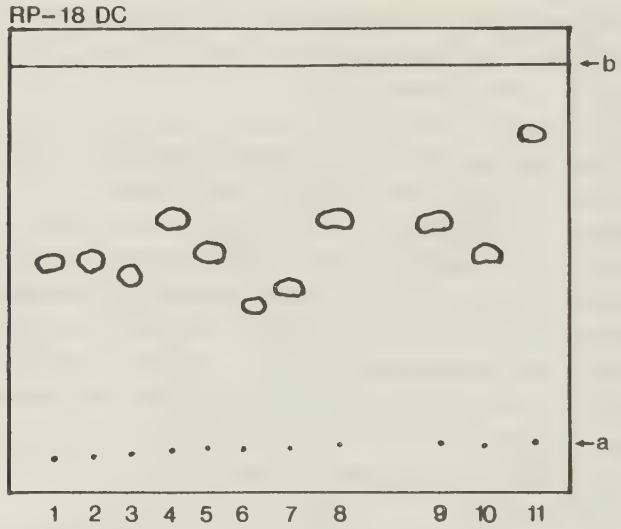
Durch DC mit RP-18 Umkehrphase lassen sich die Menachinone nach der Länge ihrer Isoprenoidseitenkette und in Abhängigkeit vom Sättigungsgrad auftrennen. Je kürzer die Seitenkette, desto größer ist der R_f-Wert des MK. (KROPPENSTEDT, 1982, COLLINS et al., 1980). Der R_f-Werte einer Mischung verschieden stark ungesättigter MK hängt von der Anzahl der Doppelbindungen ab. Durch Einfügen einer Doppelbindung verringert sich der R_f-Wert, umd zwar um etwa die gleiche Strecke, die 0,7 Isoprenoideinheiten auch bewirkt hätten.

Befinden sich also gesättigte und ungesättigte Menachinone in der Mischung, so kann eine eindeutige Einordnung der MK nach ihrer Kettenlänge nicht durch RP-18 HPTC allein erfolgen (DUNPHY et al., 1971, KROPPENSTEDT, 1982). Um das eventuelle Vorhandensein von MK mit unterschiedlichem Sättigungsgrad feststellen zu können, wurde die Ag-SC DC angewandt. Hierbei wird eine silberimprägnierte Kieselgelschicht zur Auftrennung des MK Gemischs benutzt. Während bei der RP-18 HPTC der Verlust einer Doppelbindung zu einem kleineren R_f-Wert führt, wird der R_f Wert bei der Ag-SG DC durch den Verlust der Doppelbindung vergrößert. Das MK läuft in diesem Falle so weit, wie ein ungesättigtes MK mit einer um 2 Isoprenoideinheiten kürzeren Seitenkette (KROPPENSTEDT, 1982).

In Abb. 12 sind die Chromatogramme einer RP-18 DC und der entsprechenden Ag-SG DC gezeigt.

Aufgetragen wurden neben den Extrakten aus den Versuchsorganismen B.a. (ATCC 27009) und dem w-C.hept. Fs haltigen Stamm SCH die Vergleichsextrakte mit MK unterschiedlichen Sättigungsgrads und unterschiedlicher Kettenlänge. Es werden nur die Hauptflecken gezeigt. Deutlich ist die Verringerung des R_f-Werts bei steigender Sättigung der Seitenketten oder größerer Kettenlänge auf der RP-18 HPTC zu beobachten. Der Vergleich mit der Ag-SG DC zeigt auch die oben beschriebenen Effekte bei den MK unterschiedlichen Sättigungsgrads. Aus dem Vergleich der beiden Chromatogramme läßt sich entnehmen, daß es sich bei den Hauptspots der Versuchsorganismen um MK-7 handeln muß. In Abb. 13 sind die RP-18 und Ag-SG Dünnschichtchromatogramme verschiedener Versuchsorganismen gezeigt. Auch hier konnten die Hauptflecken der Extrakte als MK-7 identifiziert werden.

Abb. 12: Analytische DC auf RP-18 und $AgNO_3$ verschieden gesättigter Menachinone aus folgenden Organismen: 1 = Thermoactinomyces vulgaris (MK-9), 2 = Rhodococcus sp. (MK-9), 3 = Mycobacterium smegmatis, 4 = B.a. (MK-7), 5 = Rhodococcus sp. (MK-8(H2)), 6 = Streptomyces griseus (MK-9(H6)), 7 = Nocardia asteroides (MK-8(H4)), 8 = SCH, 9 = B. subtilis (MK-7), 10 = Rhodococcus rhodochrous (MK-8(H2)), 11 = Vitamin K_1. a = Auftragspunkt, b = Laufmittelfront.



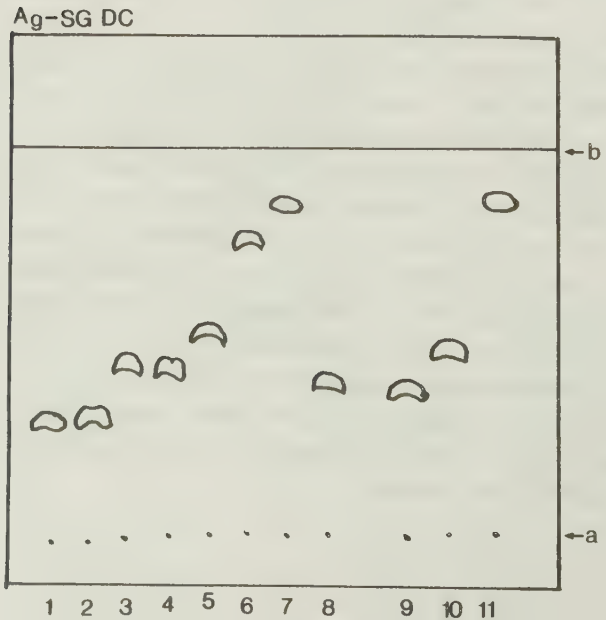


Abb. 13: Analytische RP-18 und $AgNO_3$ DC verschiedener Versuchsorganismen. 1 = Rhodococcus rhodochrous, 2 = SCH, 3 = GD1B, 4 = ATCC 27009, 5 = B. subtilis, 6 = B 45, 7 = Rhodococcus sp., 8 = Vitamin K_1. a = Auftragsstelle, b = Lösungsmittelfront.

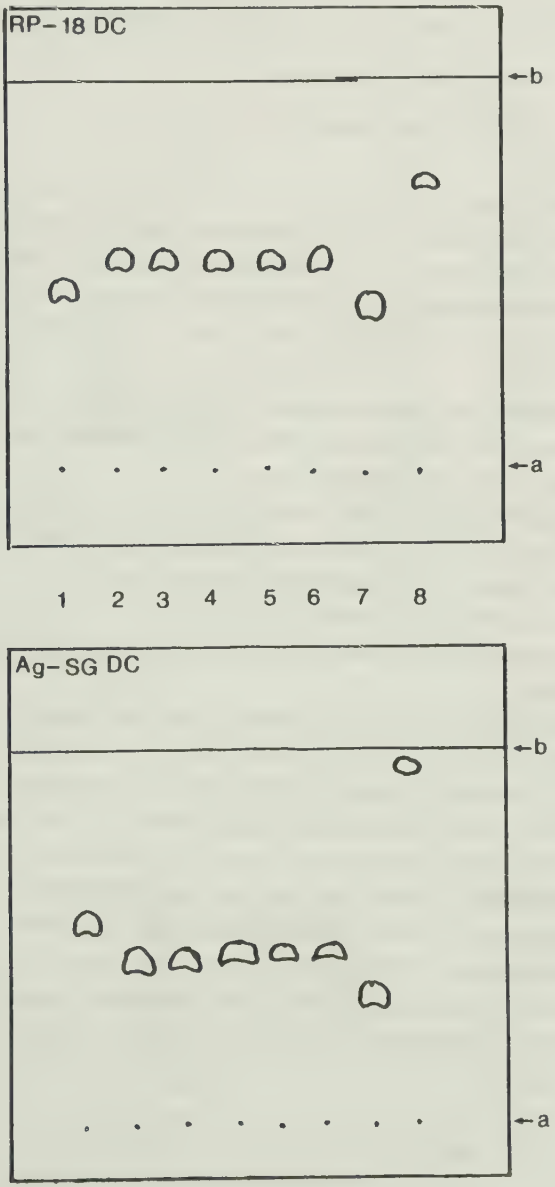


Abb. 13 zeigt die RP-18 HPDC und Ag-SG DC Chromatogramme verschiedener Versuchsorganismen. Wie bei Abb. 12 konnten alle Hauptflecken der MK-Extrakte als MK-7 identifiziert werden. Zum Vergleich wurden Extrakte von Rhodococcus sp. (DSM 43 246) mit MK-9, Rhodococcus rhodochrous (DSM 43 241) mit MK-8(H2), Vitamin K_1 und Extrakt aus B. subtilis mit MK-7 aufgetragen. Wieder ist deutlich erkennbar, daß die Hauptflecken der einzelnen Isolateextrakte das gleiche Laufverhalten zeigen wie MK-7.

3.3.4. HPLC der Menachinonextrakte

Die RP-18 HPLC arbeitet nach den gleichen Trennprinzipien, wie die RP-18 DC. Auch hier werden die Menachinonhomologen aus dem Extrakt nach ihrer Kettenlänge aufgetrennt, wobei die MK mit kurzen Seitenketten weniger Wechselwirkungen mit dem hydrophoben Säulenmaterial, dessen Oberfläche ja aus C-18 Alkanen besteht, haben, als die MK mit längeren Seitenketten.

In Abb. 14 werden die Chromatogramme der MK-Extrakte des Stammes SCH und des Stammes GD3B gezeigt. Als Vergeich ist außerdem das Chromatogramm des B.a.-MK-Extrakts aufgetragen.

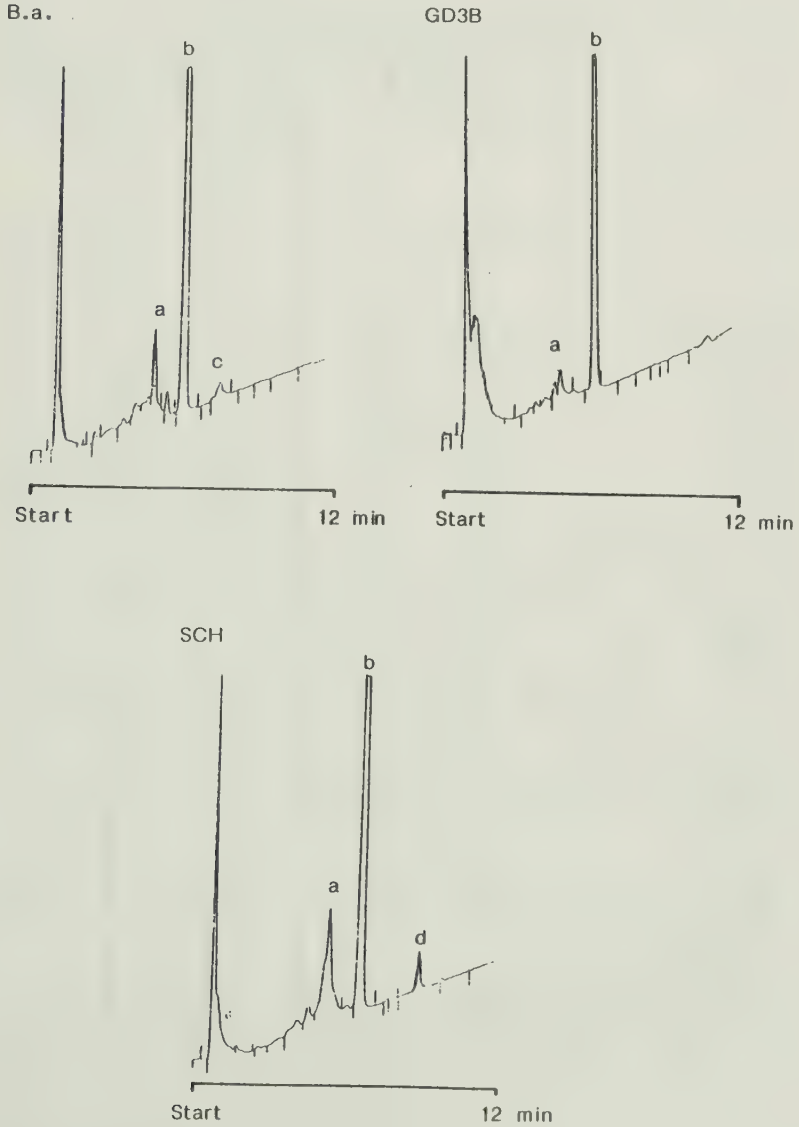
Da die kürzerkettigen MK sehr schnell von der Säule eluiert werden, d.h. die Trennung nicht optimal stattfindet, und außerdem für die taxonomische Aussage von wenig Bedeutung sind, werden in der folgenden Tabelle nur die MK mit Kettenlängen zwischen 6 und 10 angegeben.

Die MK-Kettenlängen wurden anhand von Extrakten aus Vergleichsorganismen festgestellt.

Bei den Gruppen der untersuchten Stämmen ließ sich folgendes feststellen: Die B.a.-Stämme, die zu Vergleichzwecken in die Analyse aufgenommen wurden, besaßen als Haupt-MK MK-7. Das von DE ROSA et al. (1971) gefundene MK-9 konnte nicht nachgewiesen werden. Als Nebenkomponenten konnten MK-6 und MK-8 nachgewiesen werden. Inzwischen konnte KROPPENSTEDT (BLUMENSTOCK, 1984) auch MK-9 bei B.a. ATCC 27009 nachweisen. Allerdings benutzte er eine andere Trennmethode, und setzte zusätzlich Silber beschichtetes Säulenmaterial ein, welches in dieser Arbeit wegen limitierter Apparatekapazität nicht angewendet werden konnten.

Bei den w-C.hex. Fs haltigen Isolaten konnte kein längerkettiges MK

Abb. 14: RP-18 HPLC Chromatogramme der Menachinonextrakte aus den Stämmen GD3B, SCH, und als Vergleich B.a. ATCC 27009. a = MK-6, b = MK-7, c = MK-8, d = MK-9. Die Chromatogramme hatten eine Laufzeit von 12 min.



als MK-7, welches auch hier die Hauptkomponente ist, nachgewiesen werden. Zusätzlich war MK-6 zu finden.
Die w-C.hept. Fs haltigen Isolate besitzen wie alle anderen Bacillus Arten MK-7 als Hauptkomponente. Zusätzlich kommen MK-6 und MK-9 vor. Tabelle 7 zeigt die Menachinone der untersuchten Stämme , sowie die der Vergleichsorganismen.

Tabelle 7: Menachinonmuster der untersuchten Stämme.

Stamm	MK-6	MK-7	MK-8	MK-9	MK-10
w-C.hex. Fs haltige					
GD1B	+	++			
GD2C	+	++			
GD3B	+	++			
ND2B	+	++			
GD1A	+	++			
G 1	+	++			
GK2B	+	++			
MD3A	+	++			
B 45	+	++			
B 50	+	++			
w-C.hept. Fs haltige					
SCH	+	++		+	
BGPFK	+	++		(+)	
GPFLK	+	++			
S 5	+	++		(+)	
F 1	+	++		(+)	
B. a.					
ATCC 27009	+	++	+		
DSM 448	+	++			
DSM 452	+	++	+		
DSM 455	+	++	+		
B. coagulans					
ATCC 7050	+	++	+		
Rhodococcus sp.	+	+	+	++	+

3.4. DNA: BESTIMMUNG G+C-GEHALTS

Die Basenzusammensetzung der DNA ist ein wichtiges Merkmal in der Bakterientaxonomie. Nah verwandte Stämme unterscheiden sich nicht wesentlich in ihrer DNA-Zusammensetzung, d.h. im prozentualen Anteil der beiden unterschiedlichen Basenpaare. Diese Eigenschaft wird als prozentualer Gehalt an Guanin und Cytosin (mol% G+C) der DNA ausgedrückt. Ein Unterschied von 5 und mehr mol% G+C bei zwei Stämmen bedeutet, daß sie nicht einer Art angehören (PRIEST, 1981).

3.4.1. Die DNA-Extraktion

Bei der Extraktion der DNA der Versuchsstämme wurden folgende Beobachtungen gemacht:
a) bei den w-C.hex. Fs haltigen Stämmen, sowohl bei den Isolaten als auch bei den B.a. Stämmen, ließen sich die Zellen nicht mit der benutzten Methode aufschließen, wenn sie in der spätlogarithmischen oder der stationären Phase geerntet worden waren.
Die w-C.hept. Fs haltigen Stämme ließen sich auch in den späten Wachstumsphasen aufschließen.
b) Schloß man direkt an die Lyse der w-C.hex. Fs haltigen Zellen eine Proteinfällung an, so war die DNA in den folgenden Reinigungsschritten nicht mehr nachweisbar. Dieser Effekt blieb erhalten, wenn man direkt an die Lyse eine Proteinase K Behandlung anschloß. Wurde statt der Proteinase K die Pronase E wie im Methodenteil beschrieben eingesetzt, blieb die DNA der Stämme weiterer Reinigung zugänglich.
Ob dieser Effekt durch sehr aktive DNasen, die beim Zellaufschluß wirksam wurden, oder durch Proteine, die sehr fest mit der DNA verbunden vorlagen und bei der Ausfällung die DNA 'mitzogen', bewirkt wurde, wurde nicht festgestellt.

3.4.2. Nachweis der Reinheit der DNA-Proben und Konzentrationsbestimmung

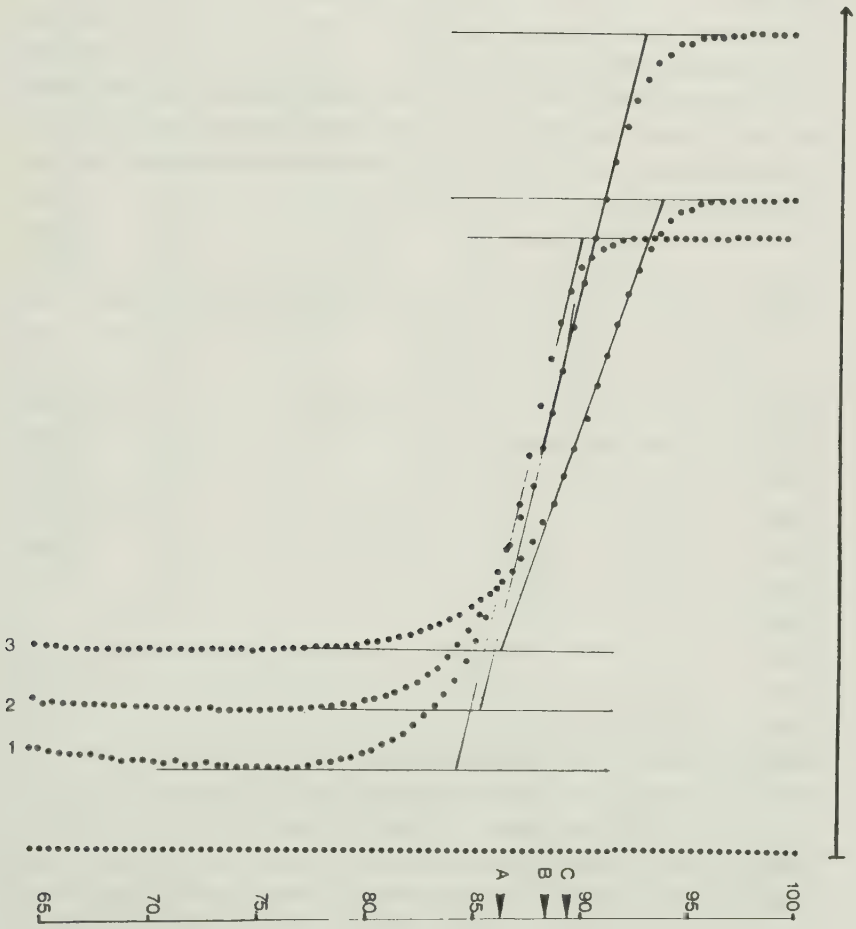
Um festzustellen, ob die DNA nach den Extraktionsschritten zur weiteren Verwendung genügend gereinigt, d.h. protein- und phenolfrei war, wurden wie im Methodenteil beschrieben, verschiedene Verfahren ange-

wandt. Zum einen wurde die UV-Absorption bei den Wellenlängen 230, 260 und 280 nm gemessen. Der DNA spezifische Peak ist bei 260 nm. Der Absorptionswert bei dieser Wellenlänge wurde mit den anderen beiden ins Verhältnis gesetzt. Zur weiteren Bearbeitung wurden DNA-Proben benutzt, bei denen das Absorptionsverhältnis 230/280/260 gleich 0,5/0,5/1 oder kleiner war, d.h. die protein- und phenolspezifischen Peaks höchstens die halbe Absorption des DNA-spezifischen Peaks zeigten (JOHNSON, 1981).
Aus der Höhe des Absorptionspeaks ließ sich außerdem die Konzentration der eingesetzten DNA berechnen. Dabei mußte festgestellt werden, daß diese Messmethode in Konzentrationsbereichen die ab 50 µg/ml und größer lagen, sehr gut funktionierte, bei kleineren Konzentrationen, wie sie bei der DNA/DNA-Hybridisierung notwendig waren, jedoch zu fehlerhaften Messungen führte.
Die in diesen Fällen angewandte Diphenylamin-Methode führte in den Bereichen sehr kleiner DNA-Konzentrationen zu guten Ergebnissen.

3.4.3. Der G+C-Gehalt der DNA der Stämme

Um den G+C-Gehalt der DNA der Stämme zu ermitteln, wurde eine Schmelzpunktbestimmung über die hyperchromatische Verschiebung gemacht (MARMUR und DOTY, 1959). Es wurde eine mittlere Ionenstärke für die Versuche (JOHNSON, 1981) gewählt, um für den G+C-Gehalt der Isolate meßbare Schmelzpunkte zu erreichen, da bei eventuellem hohen G+C-Gehalt und niedriger Ionenstärke T_m 100 °C überstiegen hätte (MARMUR und DOTY, 1962).
Die zu bestimmenden DNA-Proben wurden alle gleichzeitig im Schmelzpuffer 0,5 x SSC über Nacht dialysiert, um eventuelle präparationsbedingte Unterschiede der Ionenstärke auszugleichen.
Bei jeder Schmelzkurve wurde gleichbehandelte E. coli DNA mit bekanntem G+C-Gehalt (50,9 mol%) als Vergleichs-DNA mitgeführt.
Aus den wie in Abb. 15 zeichnerisch ermittelten Schmelzpunkten der E. coli DNA und der Probe-DNA (in der Abb. DNA von DSM 451 und BGPFLK), konnte der Guanin+Cytosin Gehalt der Probe-DNA berechnet werden (vergl. Methoden).
Die in Tabelle 8 gezeigten G+C-Gehalte aller Stämme sind die Mittelwerte aus jeweils drei Messungen. Bei den einzelnen Messungen wichen

Abb. 15: Schmelzkurve der DNA von E. coli (1): T_m 86,9 °C (A), BGPFK (2): T_m 88,4 °C (B), B.a. DSM 453: T_m 89,4 °C (C). Die G+C-Gehalte und deren Berechnung sind aus dem Text zu entnehmen.



die G+C Werte der DNA eines Stammes untereinander um nicht mehr als 0,2% ab.

Es ist zu beobachten, daß die drei Gruppen untereinander große Differenzen in ihren G+C-Gehalten zeigen. Während die w-C.hex. Fs haltigen Isolate 51,0 bis 53,3 mol% G+C besitzen, haben die B.a. Stämme G+C Gehalte, die zwischen 57.3 und 61.1 mol% liegen. Die Ergebnisse für die B.a. Stämme stimmen gut mit den von DARLAND und BROCK (1971) und den von CLAUS und BERKELEY (1986) angegebenen Werten überein, wenn man in Betracht zieht, daß sie mit unterschiedlichen Methoden gemessen wurden.

Die Gruppe der w-C.hept. Fs haltigen Isolate zeigt G+C-Gehalte von 54,0 bis 56,2 mol%.

Nach Untersuchungen von DE LEY (1970) und JONES und SNEATH (1970) sollten Stämme einer Art in ihrem G+C-Gehalt untereinander nicht um mehr als 2 bis 4% abweichen. Dieser Forderung entsprechen alle drei untersuchten Gruppen.

Tabelle 8: Guanin und Cytosin-Gehalt aller untersuchter Stämme

Stamm	G+C-Gehalt (mol%)
w-C.hex. Fs haltige Isolate	
GD3B	51,6
GD1B	52,3
B 50	51,0
MD2A	53,3
ND2B	52,0
E 1	52,5
MD3A	51,8
B 45	52,2
GD2C	52,6
GD1A	53,1
G 1	51,6
GK2B	52,2
DSM 2498	51,6

Fortsetzung **Tabelle** 8

Stamm	G+C-Gehalt (mol%)
B. a.	
ATCC 27009	61,1
DSM 448	59,4
DSM 449	59,6
DSM 451	57,3
DSM 452	58,6
DSM 453	60,3
DSM 454	58,8
DSM 455	58,4
w-C.hept. Fs haltige Isolate	
SCH	55,65
BGPFLK	55,3
GPFLK	55,8
S 5	56,9
SGE 21	55,5
SKP 21	56,0
SAW 17	56,0
SAW 12	55,8
SKP 16	56,2
SWA 15	55,7
SAW 14	54,0
SAW 15	54,0

3.5. DNA/DNA-HYBRIDISIERUNG

Die Übereinstimmung der Basenzusammensetzung zweier Stämme ist kein zwingendes Argument für die Zugehörigkeit dieser beiden Stämme zu einer Art. Erst die spezifisch ähnliche Aufeinanderfolge der Basenpaare, d.h. die genetische Information, gibt letztlich Aufschluß über die Artzugehörigkeit. Diese Ähnlichkeit läßt sich mit Hilfe der DNA/DNA Hybridisierung feststellen. Je mehr übereinstimmung die Abfolge der DNA-Basenpaarungen zweier verschiedener DNA-Proben besitzt, desto

größer wird die Hybridisierungsrate dieser beiden DNA-Proben untereinander sein.

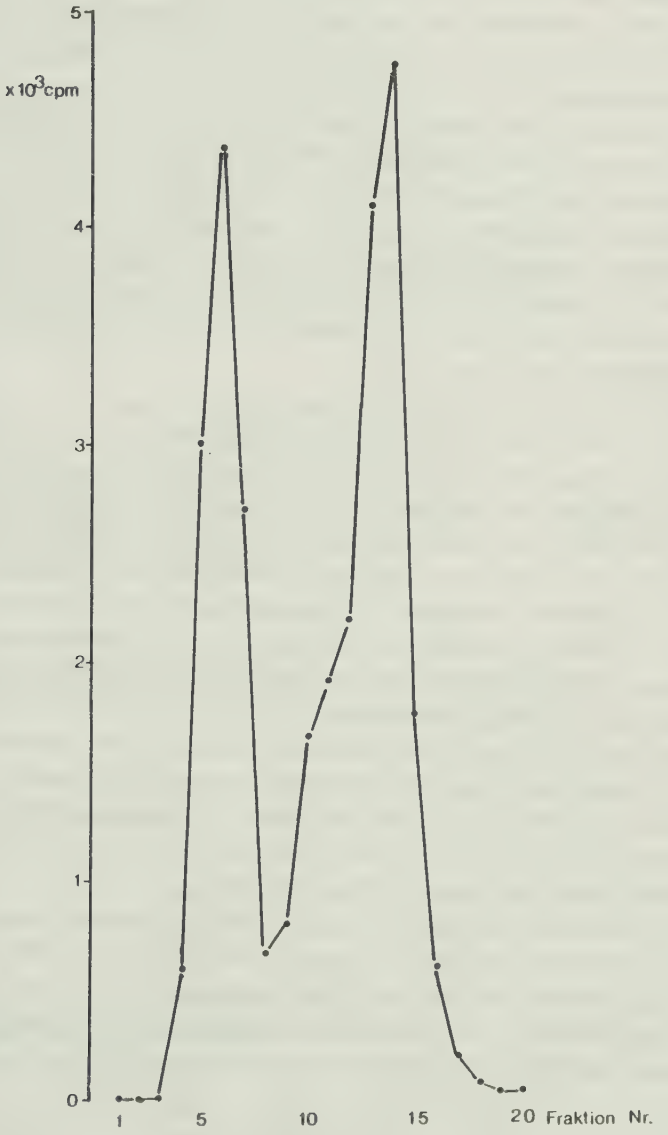
3.5.1. Die radioaktive Markierung der DNA

Bei den hier benutzten Filterhybridisierungsmethoden wurde die DNA mittels Nicktranslation radioaktiv markiert.
Bei der Markierung mit ^{3}H wurde etwa 1 µg zu markierende DNA eingesetzt. Nach der Nicktranslation und der Reinigung über die Biogel-Säule lagen 20 Fraktionen mit je 230 µl vor. Von diesen Fraktionen wurden jeweils 5 µl im LSC gemessen.
Abb. 16 zeigt das im LSC gemessene Elutionsprofil einer Säule, die markierte DNA ist in diesem Falle von B.a. ATCC 27009. Aufgetragen sind die cpm/5 µl der Fraktion. Aus den gemessenen Werten läßt sich entnehmen, daß die markierte DNA in den Fraktionen 4 bis 7 vorliegt. Der zweite Peak entspricht den nicht eingebauten Nucleotiden. Fraktion 6 enthält etwa $2x10^{5}$ cpm. Da die Konzentration an DNA in diesen Fraktionen nicht gemessen wurde, kann die spezifische Aktivität der markierten DNA nicht angegeben werden. Bei den Hybridisierungsversuchen wurden etwa $2x10^{4}$ cpm pro 100 µl Hybridisierungsmix bzw. 2 Filter eingesetzt.
Bei der Markierung mit ^{32}P wurden im allgemeinen pro µg DNA insgesamt 1 bis 3 x 10^{6} Cerenkov Counts erzielt. Bei den Hybridisierungen mit ^{32}P-markierter DNA wurde die gesamte Aktivität bei Versuchen mit 175 Filtern eingesetzt. D.h. es wurden pro Filter etwa 5 x 10^{3} bis 1,5 x 10^{4} Counts eingesetzt.

3.5.2. DNA/DNA-Hybridisierung auf Filtern

Um möglichst viele DNA-Proben in einem Ansatz, d.h. unter den gleichen Bedingungen hybridisieren zu können, wurde eine Methode gewählt, bei der die 'kalten' DNA-Proben auf Filtern gebunden vorlagen.
Dabei wurde zuerst versucht, das Millititer-Filtrationssystem der Firma Millipore zu diesem Zwecke zu benutzen. Eine Abwandlung der Methode von JOHNSON (1981), die DNA auf die Filter zu binden, gelang nicht. Nachdem bei verschiedenen Hybridisierungsansätzen nur unspezifische Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurde versucht, festzu-

Abb. 16: Elutionsprofil der Biogel-Reinigungssäule der ^{3}H markierten DNA von ATCC 27009



stellen, ob überhaupt DNA auf die Filtermembranen gebunden war. Dazu wurden zum einen die Filter und die Filtrate einem DNA-Nachweis mit der Diphenylamin-Methode unterzogen. Hierbei wurde festgestellt, daß die DNA nicht auf die Filter gebunden wurde. Die Filtrate enthielten die gesamte DNA. Um dieses Ergebnis nachzuprüfen, wurde versucht radioaktiv markierte DNA auf die Filter zu binden und nachzuweisen. Auch hier wurde die Aktivität nicht auf den Filtern, sondern im Filtrat nachgewiesen.
Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die DNA/DNA Hybridisierung auf Filtern aus APT-Papier (Aminophenylthioether-Papier), welches chemisch modifiziertes Cellulosepapier ist, durchgeführt (SEED, 1982). Im Gegensatz zum Nitrocellulosefilter wird die DNA an das APT-Papier kovalent gebunden. Ähnlich modifiziertes Cellulosepapier (Diazobenzyloxymethyl-Papier), welches ebenfalls die DNA kovalent bindet, wurde zu DNA/RNA Hybridisierungen von ALWINE et al. (1977) und STARK und WILLIAMS (1978) mit Erfolg eingesetzt.

3.5.3. Ergebnisse der DNA/DNA-Hybridisierungen

Die Ergebnisse der DNA/DNA-Hybridisierungen sind in Tabelle 9 gezeigt. Sie sollen für die einzelnen Gruppen im Folgenden erklärt werden. Die drei Gruppen lassen sich durch ihre DNA/DNA Hybridisierungswerte deutlich voneinander abgrenzen. Die Homologiewerte innerhalb einer Gruppe sind in jedem Falle höher, als diejenigen mit Organismen außerhalb der Gruppe. Dieses Ergebnis war aufgrund der großen Unterschiede im G+C-Gehalt der Gruppen vorauszusehen (s.o.).
Keine der drei Gruppen zeigt übereinstimmend große Homologiewerte, die die enthaltenen Organismen zwingend zu einer Art zugehörig zeigen würden. PRIEST (1981) gibt den Wert für intraspezifische DNA/DNA Reassoziation bei größer als 75% an. Werte unter 25% deuten nach PRIEST (1981) auf wenig verwandte Moleküle.
Legt man diesen Maßstab an, so sind alle drei Gruppen, auch die B.a. Stämme nicht einer Art zuzurechnen. OWEN und PITCHER (1985) ergänzen diese Regeln. Für sie sind Übereinstimmungen von 30-65% nur dann interpretierbar, wenn auch andere Eigenschaften der getesteten Organismen in die Bewertung miteinbezogen werden. Auf Grund dieser Überle-

gungen müssen die drei Gruppen als jeweils eine Spezies angesehen werden (s. DISKUSSION).

Die Gruppe der w-C.hex. Fs haltigen Isolate zeigt sich als die homogenste. Nur der Stamm ND2B fällt mit einem Wert von 37,8% Homologie bezgl. Stamm GD3B aus der Gruppe heraus.

Dagegen zeigen die B. acidocaldarius Stämme untereinander die größten Abweichungen. Legte man den Maßstab von PRIEST (1981) an, so wäre nur Stamm DSM 448 dem Stamm ATCC 27009 als gleicher Art zuzurechnen.

Die w-C.hept. Fs haltige Gruppe zeigt zur Hälfte die geforderte hohe Homologie, die andere Hälfte der Stämme befindet sich in der Homologiezone, die OWEN und PITCHER (1985) zum oberen Teil der Problemzone zählt, in der man die DNA/DNA-Hybridisierung nicht allein als Kriterium der Artzugehörigkeit benutzen sollte.

Tabelle 9: Ergebnisse der DNA/DNA-Hybridisierung mit der DNA aus den Stämmen GD3B (w-C.hex. Fs haltiger Stamm), SCH (w-C.hept. Fs haltiger Stamm) und dem B. acidocaldarius Typstamm ATCC 27009 als Probe. (/ = nicht getestet) Der Grad der Hybridisierung ist in % bezogen auf die homologe Hybridisierung angegeben.

	Hybridisierung mit Stamm		
Stamm	GD3B	SCH	ATCC 27009
w-C.hex. Fs haltigen Isolate			
GD3B	100	7,3	11,2
GD1B	73,5	8,7	14,0
B 50	65,7	8,5	16,4
MD2A	83,2	8,3	/
ND2B	37,8	9,9	/
E 1	104,0	10,8	/
MD3A	96,6	17,6	/
B 45	83,2	10,3	/
w-C.hept. Fs haltige Isolate			
SCH	10,7	100	13,6
SGE 21	10,2	48,9	12,8
SKP 21	10,6	106,0	14,2

Fortsetzung **Tabelle** 9

Stamm	Hybridisierung mit Stamm GD3B	SCH	ATCC 27009
BGPFLK	11,9	63,3	/
GPFLK	16,5	92,4	/
S 5	9,1	42,0	/
SAW 17	11,8	91,0	/
SAW 12	10,2	78,4	/
SKP 16	10,7	67,5	/
SWA 15	10,2	75,7	/
SAW 14	9,5	57,7	/
SAW 15	9,6	73,5	/
SGE 15	11,8	57,4	/
B. acidocaldarius			
ATCC 27009	8,2	7,5	100
DSM 448	9,8	8,3	82,1
DSM 449	8,5	7,5	26,2
DSM 452	9,7	9,9	44,4
DSM 453	7,2	7,2	51,0
DSM 454	8,5	9,5	49,9
DSM 455	9,7	7,2	66,1
DSM 451	5,5	7,6	/
E. coli	6,4	7,6	9,3

4. DISKUSSION

4.1. Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollten Bacillus Isolate, die thermoacidophile Eigenschaften besitzen und in ihren Membranen w-cyclische Fettsäuren enthalten, beschrieben und ihre Artzugehörigkeit geklärt werden.
Bei den Isolaten handelt es sich zum einen um die B.a. in ihrer Lipidzusammensetzung gleichenden Isolate von HIPPCHEN et al. (1981) und CERNY et al. (1984). Sie besitzen w-Cyclohexanfettsäuren in ihrer Membran, Hopanoide, und ein Sulfonolipid (HIPPCHEN et al., 1981, CERNY et al., 1984, DEINHARD et al., 1987a).
Die andere Isolategruppe besteht aus thermoacidophilen Bacillus Isolaten (PORALLA und KÖNIG, 1983, SAAR, 1985), die ein bisher bei Organismen einzigartiges Membranfettsäuremuster besitzen: w-Cycloheptanfettsäuren, welche zum Teil in α-hydroxylierter Form vorliegen. (PORALLA und KÖNIG, 1983, AllGAIER et al., 1985). Sie besitzen keine Hopanoide. Ein Sulfonolipid ist vorhanden (KRISCHKE, 1983).

4.2. Zusammenstellung der bereits bekannten Eigenschaften der untersuchten Stämme

4.2.1. Die w-C.hex. Fs haltigen Isolate

Die w-C.Hex.Fs haltigen Stämme wurden 1981 von HIPPCHEN et al. beschrieben. In dieser Erstbeschreibung wurden die Lipide (Fs und Hopanoide), sowie einige morphologische und physiologische Daten der Stämme vorgestellt.
In meiner Diplomarbeit (DEINHARD, 1983) konnte ich einige weitere physiologische Charakteristika der Stämme beschreiben. Zum Teil konnte ich die Ergebnisse von HIPPCHEN et al. (1981) nicht bestätigen.
CERNY et al. (1984) beschrieben einen weiteren Stamm, den sie aus Apfelsaft isoliert hatten, und der den Isolaten von HIPPCHEN et al. (1981) sehr ähnlich war. Tabelle 10 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der genannten Arbeiten.

Tabelle 10: Eigenschaften der w-C.hes. Fs haltigen Isolate aus Boden und Fruchtsaft. (/ = nicht getestet, s = subterminal, t = terminal; V.-P.-Reakt. = Voges-Proskauer-Reaktion)

Arbeitsgruppe	HIPPCHEN et al.(1981)	DEINHARD (1983)	CERNY et al.(1984)
Gesamtzahl der Stämme	11	13	1
Test			
Gram-Reakt.	/	+	+
KOH-Test	/	-(4+)	/
Sporenlage	t-s	t-s	st
Temp.-Ber.(°C)	22-70	30-60	26-50
pH-Ber.	3-7	2,5-5,8	2,5-5,5
V.-P.-Reakt.	-(1+)	-(4+)	/
Indolprod.	/	-	/
Dihydroxyaceton	/	-	/
Wachstum i. Gegenwart			
von 3% NaCl	/	-(3+)	/
von 5% NaCl	/	-	/
Katalase	/	+	+
O_2-Abhäng.	/	oblig. aerob	oblig. aerob
Lipide			
w-C.Hex Fs	+	/	+
Hopanoide	+	/	+
C-Quellen			
Saccharose	+	/	/
Glycerin	+(1-)	+(2-)	/
Gluconat	+	+(5-)	/
Sorbitol	+(1-)	/	/
Inositol	+/-	/	/
Stärke	-(1+)	/	/
Fructose	/	-(5+)	/
Xylose	/	-(1+)	/
Cellobiose	/	+(4-)	/
Trehalose	/	-(4+)	/

Fortsetzung **Tabelle** 10

Arbeitsgruppe	HIPPCHEN et al.(1981)	DEINHARD (1983)	CERNY et al.(1984)
Test			
Mannit	/	+(4-)	/
Dulcit	/	-(4+)	/
Glykogen	/	+(2-)	/
Esculin	/	+(4-)	/
Xylan	/	-(3+)	/
Cellulose	/	-(4+)	/
Inulin	/	-(4+)	/

CERNY et al. (1984) testeten auch Resistenz gegen verschiedene Antibiotika, da diese Tests nur mit einem Stamm durchgeführt wurden, sind sie in der Tabelle 9 nicht aufgeführt.
BLUMENSTOCK (1984) testete den Stamm GD3B nach klassischen Methoden. Die Ergebnisse sind hier nicht im einzelnen aufgeführt, da die meisten Testmedien anders definiert waren als die oben benutzten. Die oben beschriebenen biochemischen und physiologischen Test reichten allerdings nicht aus, um die Isolate zweifelsfrei B.a. zuzuordnen oder von ihm zu unterscheiden.

Weitere Charakteristika der w-C.hex. Fs haltigen Isolate sind das Vorhandensein eines Sulfonolipids, welches die gleichen chromatographischen Eigenschaften, wie das bei B.a. gefundene besitzt (DEINHARD et al., 1987a).
Außerdem konnten in der letzten Zeit Phagen aus Boden isoliert werden, die nur die w-C.hex. Fs haltigen Isolate lysieren, nicht aber B.a.. (LÖFFELHOLZ, pers. Mitteilg.) Ein Großteil der Isolate von HIPPCHEN et al. (1981) besitzen 7 verschieden große Plasmide, der Stamm von CERNY et al. (1984) besitzt 6 Plasmide (DECKER, 1987).

4.2.2. Die w-C.hept. Fs haltigen Stämme

Die von PORALLA und KÖNIG (1983) und SAAR (1985) aus Boden isolierten Bacillus Stämme unterschieden sich von den oben beschriebenen Bacillus Stämmen deutlich. Zwar hatten sie ein ähnliches pH und Temperatur-

Spektrum wie diese, aber ihre Lipide zeigten eine bei anderen Organismen noch nie gefundene Komponente: sie besitzen w-C.hept. Fs.
Im Gegensatz zu den anderen w-alicyclisch Fs besitzenden Stämmen haben sie keine Hopanoide. Ein Sulfonolipid ist vorhanden (KRISCHKE, 1983). ALLGAIER et al. (1985) konnten zeigen, daß die w-C.hept. Fs zum Teil in α-Stellung hydroxyliert vorliegen.
Ein weiteres Charakteristikum ist ihre strikte Hefeextraktabhängigkeit. Die Stämme benötigen Pantothenat, Isoleucin und Methionin oder Vitamin B_{12} (SAAR, 1985).

4.3. Wann gehören zwei Bakterienstämme zu einer Art?

Die Definition der biologischen Art oder Species ist nach MAYR (1963) folgende:

> Eine Art ist eine Fortpflanzungsgemeinschaft von (fortpflanzungsmäßig von anderen isolierten) Populationen, die eine spezifische Nische in der Natur einnimmt.

Damit ist der biologische Artbegriff nicht auf Gruppen von Organismen anwendbar, die sich nur asexuell vermehren, wie die Bakterien.
Wie soll man nun die Bakterienart definieren? Lange Zeit stand man der Forderung nach einer Definition relativ hilflos gegenüber, sodaß es zu der Aussage kam, daß zu einer bestimmten Bakterienart diejenigen Organismen gehören, die ein erfahrener Taxonom als zu dieser Art zugehörig erklärt (GORDON, 1977).
Welche Kriterien kann man anlegen, um zu einer Umgrenzung einer Gruppe von Organismen zu einer Art zu kommen? Ganz offensichtlich ist, daß die Kriterien durch die Forderung der Überprüfbarkeit limitiert sind. Die Überprüfbarkeit ist wiederum an vorhandene Methoden gebunden.
So erweiterten sich die Möglichkeiten der morphologischen Beschreibung der Bakterien mit der Erweiterung der mikroskopischen Methoden. Physiologische Merkmale konnten mit der Möglichkeit reine Substanzen einzusetzen und auch zu analysieren immer sicherer bestimmt werden. Als Beispiel seien die Werke zur Bacillus-Taxonomie von SMITH et al. (1946) genannt, die noch mit Medien aus teils undefinierten Bestandteilen arbeiteten, und das Folgewerk von GORDON et al. (1973), die mit weitgehend definierten Medien arbeiteten. Variationsmöglichkeiten eines Tests sollten im idealen Falle nicht vorhanden sein. Um dies zu erreichen mußten Standardbedingungen und -tests eingeführt werden,

wie z.B. bei GORDON et al. (1973). Doch selbst standardisierte Methoden bieten noch keine Gewähr dafür, daß in jedem Falle die Ergebnisse eines Tests bei dem gleichen Organismus übereinstimmen (SNEATH und COLLINS, 1974).

Eine weitere Schwierigkeit bei der taxonomischen Einordnung von Bakterien über phänotypische Merkmale besteht darin, daß theoretisch eine extrem große Menge von Tests möglich ist. Deswegen muß notwendigerweise eine Auswahl getroffen werden, wobei die Gefahr besteht, daß genau die zur Differenzierung notwendigen Eigenschaften nicht erfasst werden (STANIER et al.,1976). Trotz dieser Einschränkung ist die Feststellung phänotypischer Eigenschaften zur Identifizierung von Bakterien notwendig. Durch die Anwendung numerischtaxonomischer Methoden, bei denen so viele Eigenschaften wie möglich getestet und auf rechnerischem Wege miteinander verglichen werden, konnten signifikante Verbesserungen in der Klassifizierung und Identifizierung verschiedener bakterieller Taxa erreicht werden (GOODFELLOW, 1977, JONES und SACKIN, 1980, PRIEST et al. 1981, LOGAN und BERKELEY, 1981).

Der entscheidende Schritt zu einer allgemeinen Artdefinition gelang allerdings erst, als man die DNA zur Beschreibung der Art mitheranzog. Die Basenzusammmensetzung der DNA ist eine der wenigen chemischen Konstanten bei Bakterien (DE LEY et al., 1970) und wird als G+C-Gehalt der DNA angegeben. Im Reich der Bakterien sind G+C-Werte von 23 bis 78 mol% zu finden. Da die Basenzusammensetzung aber noch keinen Hinweis auf die Sequenz gibt, ist mit übereinstimmendem G+C-Gehalt allein die Frage nach der Artzugehörigkeit zweier Organismen noch nicht zu lösen. Andererseits kann die Zugehörigkeit zur gleichen Art bei unterschiedlichem G+C-Gehalt ausgeschlossen werden (GOODFELLOW und MINNIKIN, 1985).

Die Basensequenz ist das wesentliche Kriterium bei DNA/DNA Hybridisierungen. Diese Methode bietet die sicherste Möglichkeit die Artzugehörigkeit zweier Bakterienstämme gleicher Basenzusammensetzung festzustellen (GOODFELLOW und MINNIKIN, 1985).

4.4. Das C-Quellenspektrum: das API-CH50-System und Numerische Taxonomie

In dieser Arbeit wurde, um die Stämme streng standardisierten Bedingungen unterwerfen zu können, die C-Quellen-Verwertung mit dem API-

CH50-System getestet. Da es sich bei allen Stämmen um Thermoacidophile handelte, war eine Anpassung des Systems für diese Stämme relativ einfach. Das Flüssigmedium wurde auf den entsprechenden pH (4 oder 4,3) gebracht, der passende Indikator benutzt, und die Wachstumstemperatur wurde auf 50 °C eingestellt.

Hiermit war ein gutes Instrument zur Feststellung der Verwertung verschiedenster C-Quellen, wie sie im API-CH50-System enthalten sind, gegeben.

Die Ergebnisse für die einzelnen Stämme waren gut reproduzierbar. Auch die quantitative Einteilung der Säureproduktion wurde so gewählt, daß keine Schwierigkeiten bei der Unterscheidung der vier verschiedenen Grade entstanden. Bei einer feineren Skala wurde es unmöglich die einzelnen Farbstufen des Indikators eindeutig zuzuordnen.

Da die Inkubationstemperatur (50 °C) so gewählt war, daß alle Stämme wachsen konnten, also nicht am Temperaturoptimum der Stämme lag, wurde nicht das Wachstum, sondern die Säurebildung aus den einzelnen C-Quellen protokolliert. Damit konnte sichergestellt werden, daß Stämme, die nur ein geringes Wachstum zeigen in dem miniaturisierten Testsystem (die einzelnen Küvetten enthalten nur 300 µl Medium) nicht übersehen wurden.

Aus den Ergebnissen ließen sich die im folgenden beschriebenen Stoffwechseltendenzen für die drei untersuchten Gruppen von Stämmen feststellen. Die beiden Gruppen der w-C.hex. Fs haltigen Stämme können im Vergleich zu den w-C.hept. Fs haltigen Stämmen mehr und molekular unterschiedlichere C-Quellen verwerten. Die B. a. Stämme zeigen die größere Kapazität Di- und Polysaccharide zu verwerten, die w-C.hex. Fs haltigen Isolate dagegen können unterschiedliche Alkohole besser verwerten als B.a.. Das C-Quellen Spektrum der w-C.hept. Fs haltigen Stämme ist zum einen sehr viel kleiner als das der beiden anderen Gruppen, zum anderen sind fast alle dieser Stämme in der Lage mit L-Fucose und 5 Keto-Gluconat Säure zu bilden, was die w-C.hex. Fs haltigen Stämme nicht können. Zu den w-C.hex. Fs haltigen Isolaten sei angemerkt, daß alle getesteten Stämme mit Erythritol Säure bilden konnten. Vergleicht man die C-Quellenspektren der hier untersuchten Stämme mit denen der großen Studie von LOGAN und BERKELEY (1984), so kann man feststellen, daß keine andere Bacillus-Art diesen Alkohol verwerten kann. Es sei allerdings auf die in der Einleitung angesprochenen Einwände von PRIEST (1981) hingewiesen, daß der Vergleich

metabolischer Eigenschaften sehr vorsichtig zu bewerten ist, da es sich bei der Gattung Bacillus um eine physiologisch äußerst heterogene Gruppe handelt.

Da die Ergebnisse des API-CH5O-Tests durch ihre Menge unübersichtlich sind, vor allen Dingen die Ähnlichkeit der Stämme untereinander durch eine listenförmige Darstellung nicht sehr unterstreichen, wurden die Ergebnisse zusätzlich mit den Mitteln der Numerischen Taxonomie untersucht. Hierbei ist zu bedenken, daß die Numerische Taxonomie eigentlich eine Methode ist, bei der versucht wird, so viele Eigenschaften unterschiedlichster Art wie möglich miteinzubeziehen. Hier wurde versucht mit einem relativ begrenzten Satz von Eigenschaften, der noch dazu nur aus dem C-Quellenverwertungsspektrum der Stämme besteht, die Gruppen der Stämme voneinander zu trennen. Hieraus und aus der angewandten Codierungsmethode (s.o.) lassen sich auch die relativ niedrigen Ähnlichkeitswerte der Cluster erklären. Der Unterschied in einer einzelnen Eigenschaft bedeutet, daß die Ähnlichkeit der beiden Stämme um mindestens 2% kleiner als 100 ist.

Trotzdem ließen sich die Gruppen der w-C.hex. Fs haltigen Stämme voneinander abgrenzen. Die B.a. Stämme bilden in jedem Falle ein Cluster für sich. Auch die w-C.hept. Fs haltigen Stämme lassen sich deutlich von B.a. unterscheiden. Einzig bei den w-C.hex. Fs haltigen Isolaten ist ein Stamm enthalten, der den Stämmen mit w-C.hept Fs ähnlicher ist als der Gruppe mit der eigenen Fs. Bei diesem Stamm reicht die Anwendung des API-CH5O-Testsystems nicht zu einer eindeutigen Gruppenzuordnung aus und es müßten weitere Kriterien zur Identifizierung benutzt werden.

4.5. Die Menachinone

Die bei allen untersuchten Gruppen gefundenen Menachinonmuster bestätigen deren Zugehörigkeit zur Gattung Bacillus. Wie aus dem Übersichtsartikel von COLLINS und JONES (1981) hervorgeht, ist die Gattung Bacillus in ihrer Menachinonzusammensetzung gekennzeichnet durch das überwiegende Auftreten von MK-7 als Hauptkomponente. Nur bei B. lentus, B. pantothenticus und B. thuringiensis fanden HESS et al. (1979) andere Hauptkomponenten. DE ROSA et al. (1983) fanden, daß B.a. als Hauptkomponente MK-9 besitzt. Dies konnte von KROPPENSTEDT (BLUMENSTOCK, 1983, CLAUS und BERKELEY, 1986) nicht bestätigt werden. Er fand

zwar MK-9, aber nicht als Hauptkomponente. In der hier vorliegenden Arbeit konnte bei B.a. MK-9 nicht nachgewiesen werden.
Bei den w-C.hex. Fs haltigen Isolaten konnten keine MK, die längere Ketten als MK-7 hatten, nachgewiesen werden. MK-7 war Hauptkomponente. Auch bei den w-C.hept. Fs haltigen Isolaten war dies die Hauptkomponente. Zusätzlich besaßen sie auch MK-9. MK mit kürzeren Ketten als MK-5 wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt (vergl. Ergebnisse). Deswegen konnte das von COLLINS und LANGWORTHY (1983) beschriebene Vorkommen von MK-3 bei B.a. nicht nachgewiesen werden.
Die Lipochinone sind wertvolle taxonomische Charakteristika. So sind die gram-negativen Bakterien durch das Vorhandensein von verschiedenen Lipochinonen gekennzeichnet. Bei ihnen kommen Ubichinone, Menachonine und Demethylmenachinone vor, die zum Teil sogar bei den einzelnen Organismen in Mischung auftreten können (COLLINS und JONES, 1981). Cyanobakterien besitzen Plastochinone. Dagegen besitzen die gram-positiven nur Menachinone, einzige Ausnahem sind einige Streptococcus Arten, die Demethylmenachinone besitzen (COLLINS und JONES, 1979a, COLLINS und JONES 1979b).
Betrachtet man die Gattung Bacillus insgesamt, so ist das Vorhandensein von MK-7 als Hauptkomponente eines der wenigen übereinstimmenden Merkmale aller Arten (vergl. COLLINS und JONES, 1981).

4.6. Der G+C-Gehalt der DNA

Ein Bakterienstamm gehört zu einer bestimmten Art, wenn die G+C-Gehalte untereinander nicht abweichen und die physiologischen und anderen biochemischen Eigenschaften übereinstimmen. Übereinstimmung der G+C-Gehalte allein reicht zwar nicht aus, um einen Stamm als einer bestimmten Art zugehörig zu klassifizieren, aber der G+C-Gehalt gehört zu den Merkmalen, die bei der Beschreibung einer Art zu den wichtigsten gehören.
Die hier untersuchten Stämme ließen sich anhand des G+C-Gehalts leicht in drei Gruppen teilen. Die B.a. Stämme hatten G+C-Werte von 57,3 bis 61,1 mol%. Der Durchschnittswert beträgt 59,25 mol% G+C. Damit lassen sie sich ohne Zweifel von den w-C.hex. Fs haltigen Isolaten abgrenzen, deren G+C Gehalt zwischen 51,0 und 53,3 mol% liegt (Durchschnitt 52,1%). Die w-C.hept. Fs haltigen Stämme haben G+C-Gehalte von 54 bis 56,9 mol% (Durchschnitt 55,6 mol%). Damit unterscheiden sich die in

ihren Fs übereinstimmenden Gruppen im G+C-Gehalt voneinander um 8,15%. Der G+C-Gehalt der w-C.hept. Fs haltigen Stämme liegt von dem der B.a. Stämme um 3,6% entfernt, von dem der w-C.hex. Fs haltigen Stämme um 3,4%. Vergleicht man die Stämme mit dem jeweils niedrigsten G+C-Gehalt von B.a. mit dem höchsten von den w-C.hex. Fs haltigen Isolaten, so unterscheiden sich diese beiden um 4%. Damit ist klar, daß die Stämme zwei voneinander zu unterscheidende Gruppen bilden. Die w-C.hept. Fs haltigen Stämme lassen sich zwar auf Grund des G+C- Gehalts nicht so einfach von den beiden anderen Gruppen trennen, aber die absolut unterschiedlichen physiologischen Merkmale zusammen mit dem G+C-Gehalt zeigen eindeutig, daß sie eine Gruppe für sich bilden.

4.7. Die DNA/DNA-Hybridisierungen

DNA/DNA-Hybridisierungen können klären, ob die DNA zweier Organismen, die in ihrem G+C-Gehalt übereinstimmen, auch in ihrer Sequenz, d.h. in ihrem Informationsgehalt übereinstimmen. Ist das der Fall, so kann man die beiden Organismen als zu einer Art gehörig betrachten.
DNA/DNA-Hybridisierungen gehören somit die wichtigsten Instrumenten zur Feststellung der Artzugehörigkeit.
Die Ergebnisse der hier untersuchten Stämme bestätigen im Großen und Ganzen die Gruppenzugehörigkeiten der Organismen. Zum Teil ergaben sich aber auch Resultate, die einer weiteren Interpretation bedurften. So stellte sich die Gruppe der B.a. Stämme als sehr heterogen heraus. Auch innerhalb der anderen beiden Gruppen gab es Hybridisierungsraten, die unterhalb der von OWEN und PITCHER (1985) 65% Grenze lagen, und bei denen deshalb zusätzlich weitere taxonomische Merkmale zu einer eindeutigen Differenzierung notwendig waren. Ähnliche Hetrogenität bei den Stämme von verschiedenen Bacillus Arten fanden auch SEKI et al. (1975) und SEKI et al. (1978).
Bei der Hybridisierung der DNA der Stämme mit den Typstämmen der jeweils anderen Gruppen zeigte sich jedoch deutlich, daß die Gruppen voneinander deutlich zu unterscheiden waren. Damit waren auch die G+C-Werte, die sich von ja Gruppe zu Gruppe stark unterschieden, erneut untermauert.

4.8. Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen endgültig, daß die Art B. acidocaldarius nicht die einzige acidophile, thermophile Bacillus Art ist, die w-alicyclische Fettsäuren besitzt.
Durch den Einsatz des API-CH5O-Testsystems konnten die Gruppen aufgrund ihres C-Quellenspektrums voneinander weitgehend unterschieden werden. Die Menachinonanalyse gab weitere Hinweise zur Unterscheidung der Bacillus Gruppen. Die Analyse der G+C-Gehalte und die DNA/DNA-Hybridisierungen zeigten als letzte Argumente, daß die Gruppen als einzelne Arten voneinander zu unterscheiden sind.

4.9. Thermophilie: Ist eine Definition möglich?

Bisher war in dieser Arbeit häufig die Rede von den thermophilen acidophilen Bacillus Arten. Dabei läßt sich der Begriff der Acidophilie leicht definieren. Obligat acidophil sind Stämme, die nicht bei neutralem pH wachsen können. Fakultativ acidophile sind dann solche, die bei neutralem pH zwar wachsen können, ihr Optimum aber im sauren Bereich des pH Spektrums liegen, wie z.B. bei B. coagulans..
Die Definition der Acidophilie ist deswegen so einfach, weil es einen festen Grenzpunkt, den Neutralpunkt, pH 7 gibt. Thermophilie ist dagegen sehr viel schwieriger zu definieren.
Die erste Definition ist die von CAMERON und ESTY (1926). Sie definieren Thermophilie so: obligat thermophile Organismen wachsen nicht bei Temperaturen, die unterhalb von 37 °C liegen. Fakultativ thermophile können auch unterhalb dieser Grenze wachsen, können aber auch bei Temperaturen von 55 °C wachsen. Diese alte Definition ist offensichtlich von zwei Dingen beeinflußt. Zum einen von der Tendenz, die normale Temperatur des menschlichen Organismus als Normalpunkt zu setzen, und darüberliegende Temperaturen als 'heiß' zu kennzeichnen. Zum anderen sind die als obere Temperatur genannten 55 °C offensichtlich durch die beiden bis dahin bekannten 'thermophilen' Bacillus Arten gekennzeichnet, nämlich durch B. coagulans und B. stearothermophilus. Die Definition von CAMERON und ESTY steht bezeichnenderweise in einer Publikation, die sich mit Verderbserregern in Konserven beschäftigt. Seitdem sind sehr viele verschiedene Bakterien isoliert worden, deren Wachstumsbereiche sich bis zu viel höheren Temperaturen erstrecken.

Das Archaebacterium Pyrodictium occultum (STETTER, 1982, STETTER et al., 1983) wächst sogar bei über 100 °C, mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 105 °C.
Damit liegt dem unteren Temperaturbereich des Wachstums, der zwischen etwa 0 und 40 °C liegt, und die psychrophil und mesophil wachsenden Bakterien umfaßt, ein Bereich von über 50 ° gegenüber, in welchem die Organismen alle thermophil genannt werden.
BROCK (1986) betont zum einen, daß die Bezeichnung thermophil von der Zugehörigkeit des so bezeichneten Organismus zu einem der großen Reiche der Lebewesen abhängig ist. So macht er deutlich, daß es nur Prokaryonten sind, die bei Temperaturen über 60 °C leben können. Andererseits betont auch er, daß der Temperaturbereich, in welchem die Organismen als thermophil bezeichnet werden groß ist: 'It is of some importance to emphasize that there are no real boundaries but only a continuum. Thermophilic bacteria have been described, for instance, with temperature optima of 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, and 105 °C, and at many temperatures in between those listed.'
Eine wirklich befriedigende Definition des Begriffs thermophil gibt es also nicht. HEINEN (1971) versuchte bei der Beschreibung dreier Bacillus Stämme, deren Temperaturoptima bei 80 °C liegen, den Begriff 'thermus' durch das Einsetzen des Wortes 'caldus' (heiß) zu vermeiden. Wenn in der vorliegenden Arbeit die Bezeichnung 'thermophil' benutzt wird, dann nur aufgrund der hier dargelegten Gedanken.

4.10. Einordnung der untersuchten Arten in die Gattung Bacillus

Die Gattung Bacillus ist sowohl in den physiologischen als auch in den genetischen Eigenschaften ihrer Arten sehr heterogen (vergl. Einleitung). Die G+C-Gehalt der Arten reichen von 32 bis 61%. JONES und SNEATH (1979) und BRADLEY und MORDARSKY (1976) stellten Regeln für die Interpretation des G+C-Gehalts verschiedener Arten auf. Danach gehören Stämme nicht einer Art an, wenn sie sich im G+C-Gehalt um 5% unterscheiden, und nicht einer Gattung, wenn sie sich im G+C-Gehalt um 10% unterscheiden. Aufgrund dieser Werte teilte PRIEST (1981) die Gattung Bacillus in 7 Taxa auf, wobei er auch versuchte die physiologischen Eigenschaften zu berücksichtigen. In seinem Schema erscheinen in Taxon 2 die thermophilen neutrophilen Arten B. stearothermophilus und 'B. thermodenitrificans'; B. acidocaldarius wurde aufgrund seines

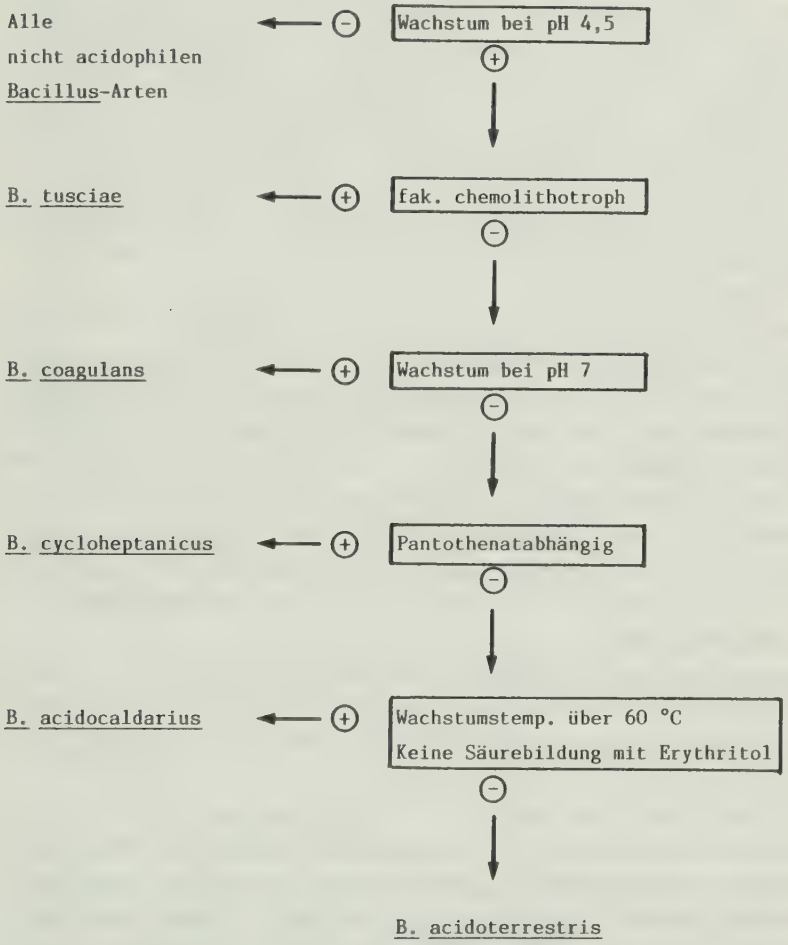
hohen G+C-Gehalts mit 'B. thermocatenulatus' zusammengestellt. Der 'thermoacidophile' B. coagulans steht in einer genetisch und physiologisch auch bei PRIEST (1981) heterogenen Gruppe.

Mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit könnten die w-alicyclische Fs besitzenden Bacillus Arten aufgrund ihrer physiologischen und genetischen Eigenschaften in eine Gruppe gestellt werden. Der G+C-Gehalt umfaßt bei ihnen 51 bis 61%, und liegt damit genau auf dem 10% Raum, den JONES und SNEATH (1979) einer Gattung zuteilen. Außerdem sind sie sich untereinander in ihren physiologischen und biochemischen Eigenschaften sehr viel ähnlicher als den anderen Bacillus Arten.

In Abb. 17 wird der Versuch gemacht einen Bestimmungsschlüssel der thermoacidophilen Bacillus Arten aufzustellen.

Natürlich sind auch andere z.B. mittels biochemischer Eigenschaften aufgestellte Differenzierungswege möglich.
In Abb. 8 ist eine Differenzierung anhand vorhandener Daten aus dem API-CH50-Testsystem gezeigt. Dort ist ebenfalls eine klare Trennung der Arten bzw. Stammgruppen, wie LOGAN und BERKELEY (1984) sie einsetzten ersichtlich. Allerdings sind die w-alicyclische Fs besitzenden Arten hier deutlich nah mit anderen thermophilen Arten zusammengestellt. Es fällt auf, daß B. coagulans mit mesophilen Arten clustert.

Abb. 17: Bestimmungsschlüssel der acidothermophilen Bacillus-Arten aufgrund physiologischer Eigenschaften.



4.11. Phylogenetische Aspekte

Um die endgültige phylogenetische Stellung der w-alicyclische Fettsäuren besitzenden thermophilen Bacillus Arten festzustellen, sind die in dieser Arbeit benutzten Methoden nicht geeignet.

Eine bewährte Methode zur Aufdeckung phylogenetischer Zusammenhänge ist die Oligonucleotid-Katalogisierung der 16S rRNA. Durch die gleichzeitige Existenz von streng konservativen Abschnitten neben stark variablen Bereichen in diesem Molekül kann man bei einer vergleichenden Analyse sowohl relativ enge Verwandtschaftsbeziehungen auf der Species-Ebene als auch phylogenetisch weit entfernte Beziehungen bis hin zu Organismenreichen feststellen (FOX et al., 1977). So konnten WOESE und FOX (1977) aufgrund der 16S rRNA Oligonucleotid-Analyse die Archaebakterien von den Eubakterien abtrennen, und als eigenes Reich beschreiben.

Auch in der Taxonomie der Eubakterien ist diese Methode von revolutionärer Bedeutung. Die Systematik der Bakterien konnte auf eine phylogenetische Grundlage gestellt werden, und es zeigte sich, daß Revisionen notwendig sind. Zum Beispiel wurden bei der Gruppe der 'Purpurbakterien' die gemeinsamen Entwicklungslinien mit nichtphototrophen gramnegativen Arten aufgedeckt (WOESE et al., 1984, WOESE et al, 1985, Woese et al, 1985, WOESE et al, 1985). Dabei stellte sich heraus, daß bisher als eine Gattung beschriebene Organismen phylogenetisch sehr weit auseinander stehen, wie z.B. die bisher als Pseudomonaden beschriebene Gruppe.

Bei den Gram-positiven konnten zwei Entwicklungslinien, die 'Clostridien'- und die 'Actinomyceten'-Linie getrennt werden, die ersteren mit niedrigem G+C-Gehalt der DNA gegenüber hohem G+C-Gehalt bei der 'Actinomyceten'-Linie (FOX et al, 1980).

In der 'Clostridien'-Linie ist die Gattung Bacillus vertreten. 1977 entstand eine erste 16S rRNA-Analyse dieser Gattung. Die Gattung besitzt einen minimalen S_{AB}-Wert von 0,5. Dies ist im Vergleich zu gram-negativen Gruppen eine relativ geringe phylogentische Distanz (STACKEBRANDT und WOESE, 1981). Den niedrigsten S_{AB}-Wert mit den anderen Vertretern dieser Gattung besitzt B. acidocaldarius mit 0,5 (WOESE, pers. Mitteilung). Das kann bedeuten, daß er sich entwicklungsgeschichtlich sehr früh aus der entstehenden Gruppe abgespalten hat. Gleichzeitig zeigten STACKEBRANDT und WOESE (1981) aber eben-

falls, daß im Vergleich zu gram-positiven Organismen anderer Gattungen B.a. eine schnellere rRNA-Mutation als andere Bacilli zeigt. Sie führen dies auf Umgebungseinflüsse auf das Ribosoms zurück, die eventuell die Mutationsrate steigern. Erhöhte Wachstumstemperatur allein scheint die Mutationsrate nicht zu steigern, wie am Beispiel von B. stearothermophilus gezeigt wurde (STACKEBRANDT und WOESE, 1981).
Die Kombination aus 16S rRNA Oligonucleotid-Analyse und Analyse des Zellwandtyps (SCHLEIFER und KANDLER, 1972) brachte neue Argumente für die Differenzierung der Gattung Bacillus in unterschiedliche Gruppen. Bei den meisten Bacillus-Arten enthält die Zellwand meso-Diaminopimelinsäure als direkte Verbindung. Nur bei der Gruppe der Bacilli, die runde Sporen bilden, wurden andere Aminosäuren wie Lysin, Aspartat und Ornithin gefunden. Diese vom m-DAP-Typus abweichenden Zellwandarten treten nur bei Bacillus-Arten, die runde Sporen besitzen, auf. Für diese , z.B. B. pasteurii, B. sphaericus und B.globisporus konnte große phylogenetische Nähe zu verschiedenen asporogenen Organismen unterschiedlichster Gattungsbezeichnung , z.B. zu Filibacter limicola einem gleitenden Bakterium (CLAUSEN et al., 1985) festgestellt werden. Die 'echten' Bacillus-Arten z.B. B. megaterium, B. subtilis und B. cereus sind phylogentisch weiter entfernt. (STACKEBRANDT et al., 1987). Die asporogenen Organismen besitzen ähnlich zusammengesetzte Zellwände, wie die runde Sporen bildenden Bacilli, sind aber zum Teil als gram-negativ beschrieben.
In der gleichen Untersuchung (STACKEBRANDT et al., 1987) wird gezeigt, daß B. stearothermophilus näher mit Thermoactinomyces vulgaris zusammensteht, als mit anderen Bacilli.
Von keinem der w-alicyclische Fs besitzenden Bacillus existiert bisher eine Analyse des Mureintyps.

Bis jetzt gibt es noch keinen Hinweis darauf, wo die beiden hier neu beschriebenen Bacillus-Arten innerhalb des phylogentischen 'Baumes' anzusiedeln sind. Bacillus acidocaldarius ist mit einem S_{AB}-Wert von 0,5 die am frühesten aus der Reihe der Bacilli abzweigende Art. Man könnte sich zum einen vorstellen, daß der hier beschriebene B. acidoterrestris eine deutlich nahe Verwandtschaft zu B. a. zeigen könnte. Neben den ähnlichen physiologischen Eigenschaften besitzen beide auch das gleiche Lipidmuster mit w-C.hex. Fs, Hopanoiden und Sulfonolipid.

Die Stellung der w-C.hept Fs haltigen Art B. cycloheptanicus ist genauso ungeklärt.
Beide Arten müßten mit der 16S rRNA Oligonucleotid-Analyse untersucht werden, um ihre phylogentische Stellung innerhalb der Gattung festzustellen. Auch der Zellwandtyp müßte untersucht werden.
Das Sulfonolipid, welches alle w-alicyclische Fs haltigen Arten besitzen, müßte im Hinblick auf die von WOESE et al. (1985) vorgestellte Hypothese eines gemeinsamen photosynthetischen Vorfahren aller Eubakterien weiter untersucht werden, da dieses Sulfonolipid bisher bei allen daraufhin untersuchten photosynthetischen Pflanzen, Algen und Bakterien vorkommt (HAINES, 1971, und BENSON, 1963, beide zitiert nach LANGWORTHY et al., 1975). Bei anderen nicht-photosynthetischen Bakterien wurde es noch nicht gefunden.

4.12. Artbeschreibung der neuen Bacillus-Spezies

Im folgenden werden die beiden neuen Bacillus Arten beschrieben: Bacillus acidoterrestris, dessen Vertreter die w-C.hex. Fs haltigen Isolate von HIPPCHEN et al. (1981) und CERNY et al. (1984) sind, und Bacillus cycloheptanicus dessen Vertreter die w-C.hept. Fs haltigen Isolate von PORALLA und KÖNIG (1983) und SAAR (1985) sind.

Abb. 18 zeigt die beiden Typstämme der Arten B. acidoterrestris und B. cycloheptanicus.

Die Beschreibungen der Arten sind entnommen aus DEINHARD et al. (1987a) und DEINHARD et al. (1987b).

Artbeschreibung von Bacillus acidoterrestris sp. nov.

Bacillus acidoterrestris (Lat. acidum Säure, Lat. terrestris aus dem Boden, acidoterrestris obligat acidophil und aus dem Boden isoliert)

Aerobe, gram-positive, endosporenbildende, stäbchenförmige Bakterien (Länge 2,9 bis 4,3 µm), Sporangien leicht geschwollen (4 Stämme nicht

geschwollen), Sporen oval (Länge 1,5 bis 1,8 µm, Breite 0,9 bis 1 µm) subterminal bis terminal.

Koloniemorphologie: rund, cremig weiß, durchsichtig bis opak, 3 bis 5 mm im Durchmesser nach 6 tägigem Wachstum auf BAM, pH 4, 50 °C.

Wachstumsfaktoren werden nicht benötigt.

Die optimale Wachstumstemperatur ist 42 bis 53 °C, abhängig vom Stamm, Temperaturbereich zwischen etwa 30 bis 55 °C, teilweise noch höher.

pH-Bereich des Wachstums: 2,2 bis 5,8.

Säurebildung aus den folgenden C-Quellen des API-CH50-Testsystems (wenn nicht alle der getesteten 13 Stämme positiv waren, ist die Zahl der positiven Stämme hinter der C-Quelle angegeben; die C-Quellen, die der Typstamm GD3B verwertet, sind unterstrichen): Glycerin, Erythritol, L-Arabinose, Ribose, D-Xylose, Adonitol (7), Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, Rhamnose, Inositol (6), Mannitol, Sorbitol (12), α-Methyl-D-Glucosid (12), Amygdalin (4), Arbutin (10), Esculin, Salicin, Cellobiose, Maltose (12), Lactose (11), Saccharose (3), Melzitose (1), D-Raffinose (2), Stärke (2), Glycogen (2), Xylit (12), ß-Gentiobiose (12), D-Turanose (2), D-Arabit (7).

Indolproduktion negativ, Dihydroxyacetonproduktion negativ, Voge-Proskauer-Reaktion negativ bei 9 Stämmen, positiv bei 4.

Wachstum in Gegenwart von NaCl: 3 Stämme wachsen mit 3% NaCl, keiner mit 5%.

Lipide: w-Cyclohexanfettsäuren überwiegend, Hopanoide, Sulfonolipid, Menachinone: MK-7 (Hauptbestandteil) und MK-6.

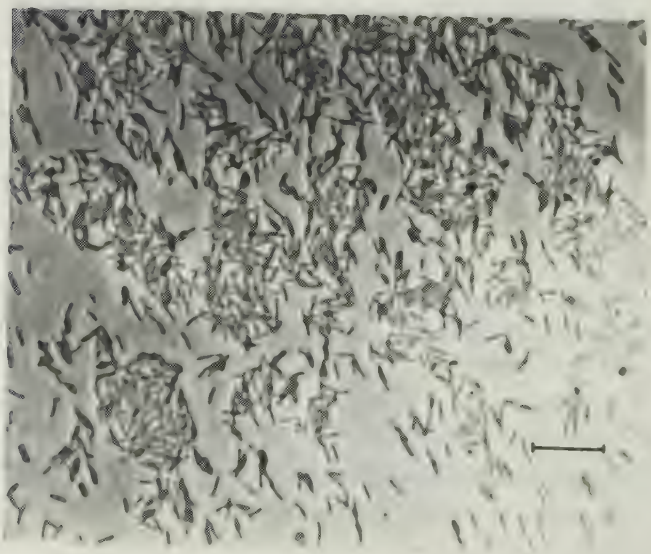
G+C-Gehalt (mol%): 51,6 bis 53,3 (T_m)

DNA/DNA-Hybridisierungswerte mit dem Typstamm von B.a. ATCC 27009 und dem Typstamm von B. cycloheptanicus sind niedrig.

Abb. 18.: Die Typstämme GD3B von B. acidoterrestris (a) und SCH von B. cycloheptanicus (b) in Phasenkontrastmikroskopie. Die Stämme wurden auf den entsprechenden Medien bis zur Sporulation bei 50 °C angezogen. Der Balken entspricht 10 µm.

a)

b)



Der Stamm GD3B ist der Typstamm der Art Bacillus acidoterrestris. Ist ist bei der DSM mit der Nummer DSM 3922^T hinterlegt. Außerdem sind dort die Stämme B 45 (DSM 3923) und GD1A (DSM 3924) hinterlegt.

Artbeschreibung von Bacillus cycloheptanicus sp. nov.

Bacillus cycloheptanicus: (Griech. kyklos Kreis, Griech. hepta Sieben; cycloheptanicus bezieht sich auf die in der Zellmembran enhaltenen w-Cycloheptan-Fettsäuren)

Aerobe Gram-positive endosporenbildende Stäbchen (Länge 2,5 bis 4,5 µm, Breite 0,35 bis 0,55 µm), Sporangien leicht geschwollen, Sporen oval (Länge 1 µm, Breite 0,75 µm), subterminal.

Koloniemorphologie auf SM-Medium: klein, rund, glatt, cremig weiß, nicht durchsichtig. In flüssigen Medien liegen in der späten log-Phase die Zellen in kurzen Ketten vor.

Wachstumsfaktoren: Ile, Met oder Vitamin B_{12}, Panthotenat.
pH: Wachstum zwischen pH 3 und 5,5 mit einem Optimum bei 3,5 bis 4,5. Bei Medien, die Aminosäuren enthalten, ist ein Anstieg des pH-Werts beobachtbar, der von der Menge der enthaltenen Aminosäuren und der von fermentierbaren Zuckern abhängt.

Optimale Wachstumstemperatur ist 48 °C.

Säureproduktion aus den folgenden C-Quellen des API-CH5O-Systems (wenn weniger als die untersuchten 15 Stämme positiv waren, ist ihre Anzahl in Klammern angegeben; die C-Quellen, die vom Typstamm SCH verwertet wurden, sind unterstrichen): D-Arabinose (1), Ribose (11), D-Xylose, Galactose, Glucose, Fructose, Mannose, Sorbose (13), Rhamnose (13), Dulcitol (12), Inositol (12), Mannitol, Sorbitol (14), Amygdalin (1), L-Lyxose (1), L-Fucose (13), D-Arabitol (1), 5 Keto-Gluconat (13), Esculin wird hydrolysiert.

Lipide: 90% der Fettsäuren der Membran bestehen aus w-Cycloheptyl-undecan Säure, w-Cycloheptyl-tridecan Säure und w-Cycloheptyl-α-hydro-

xyundecan Säure. Ein Sulfonolipid ist vorhanden. Menachinone sind MK-7 (Hauptkomponente) und MK-6 und MK-9 als Nebenkomponenten.

G+C-Gehalt: 54,0-56,9 mol% (T_m)

DNA/DNA-Hybridisierungswerte mit den Typstämmen von B.a. und B. acidoterrestris sind niedrig.

Die Stämme SCH, der Typstamm der Art Bacillus cycloheptanicus, SGE 21 und S 5 sind bei der DSM unter den Nummern DSM 4006^T, DSM 4007 und DSM 4005 hinterlegt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zwei Bacillus-Isolategruppen wurden taxonomisch untersucht. Beide Gruppen sind thermoacidophil und besitzen hauptsächlich w-alicyclische Fettsäuren in ihrem Fettsäuremuster. Die Isolate von HIPPCHEN et al. (1981) und CERNY et al. (1984) besitzen außer w-Cyclohexanfettsäuren auch Hopanoide und ein Sulfonolipid, und ähneln damit dem ebenfalls thermoacidophilen B. acidocaldarius. Dieser wurde als Vergleichsart mituntersucht. Die Isolate von PORALLA und KÖNIG (1983) und SAAR (1985) besitzen die bisher bei anderen Organismen noch nicht gefundenen w-Cycloheptanfettsäuren. Sie besitzen keine Hopanoide, jedoch ein Sulfonolipid mit den gleichen chromatographischen Eigenschaften, wie das obige.

Mit der Menachinon-Analyse konnte bestätigt werden, daß sowohl die beiden Isolategruppen als auch B. acidocaldarius das für Bacillus typische Menachinon MK-7 besitzen. Die w-C.hex.Fs haltige Gruppe besitzt als Nebenkomponente MK-6, die w-C.hept. Fs haltigen Isolate besitzen als Nebenkomponenten MK-6 und MK-9.

Das C-Quellenspektrum wurde untersucht und numerisch-taxonomisch mit einem dazu in Kooperation erstellten Computerprogramm ausgewertet. Dabei zeigten die w-C.hex. Fs haltigen Isolate eine deutlich vom B.a.-Cluster abgetrennte Clusterbildung. Die w-C.hept. Fs haltigen Stämme ließen sich von den w-C.hex. Fs haltigen Gruppen unterscheiden. Eine Ausnahme bildete der Stamm GD1A, der mit den w-C.hept. Fs haltigen Stämmen clusterte, obwohl er in seinen übrigen Eigenschaften mit der Gruppe der w-C.hex. Fs haltigen Isolate übereinstimmte.

Anhand von Eigenschaften der DNA der beiden Isolategruppen konnte der Beweis erbracht werden, daß es sich um zwei neue Arten handelt. Die w-C.hex. Fs haltigen Stämme besitzen einen G+C Gehalt von 51,6 bis 53,3 mol% und unterscheiden sich damit von den B. acidocaldarius-Stämmen, deren G+C Gehalt zwischen 57,3 und 61,1 mol% liegt. Die w-C.hept. Fs haltigen Isolate besitzen einen G+C Gehalt von 55,0 bis 56,9 mol% und sind damit und auf Grund ihrer weiteren physiologischen und biochemischen Eigenschaften als weitere Art zu betrachten. Diese Schlußfolgerungen wurden auch durch DNA/DNA-Hybridisierungen mit den Typstämmen

der beiden jeweils anderen Bacillus-Arten bestätigt. Dabei waren die Hybridisierungsraten der Gruppen mit den Typstämmen der anderen Arten gering. Die Hybridisierungen der Gruppen mit der DNA des jeweiligen eigenen Typstamms zeigten, daß es sich um jeweils eine Art handelte.

Die w-Cyclohexanfettsäure haltigen Bacillus-Isolate wurden unter dem Namen Bacillus acidoterrestris sp. nov. als neue Art beschrieben.

Die w-Cycloheptanfettsäure haltigen Bacillus-Isolate wurden unter dem Namen Bacillus cycloheptanicus sp. nov. als weitere neue Art beschrieben.

Die Stellung der beiden neuen Arten in der Gattung Bacillus und phylogenetische Aspekte wurden diskutiert.

6. LITERATUR

ALLGAIER, H., PORALLA, K., JUNG, G.: ω-cycloheptyl-α-hydroxy-undecanoic acid, a new fatty acid from a thermoacidophilic Bacillus species. Liebigs Ann. Chem. 378-382 (1985)

ALWINE, J.C., KEMP, D.J., STARK, G.E.: Method for detection of specific RNAS in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 5350-5354 (1977)

BARTHOLOMEW, J.W., PAIK, G.: Isolation and identification of obligate thermophilic sporeforming Bacilli from ocean basin cores. J. Bacteriol. 92, 635-638 (1966)

BECKER, M.E., PEDERSON, C.S.: The physiological characteristics of Bacillus coagulans (Bacillus acidurans) J. Bacteriol. 59, 717-725 (1950)

BENZ, R., HALLMANN, D., PORALLA, K., EIBL, H.: Interaction of hopanoids with phosphatidylcholines containing oleic and w-cyclohexyldodecanoic acid in lipid bilayer membranes. Chem. Physics Lip. 34, 7-24 (1983)

BLUMENSTOCK, I.: Bacillus coagulans HAMMER 1915 und andere thermophile oder mesophile säuretolerante Bacillus Arten - eine taxonomische Untersuchung. Dissertation Universität Göttingen (1984)

BOEYE, A., AERTS, M.: Numerical taxonomy of Bacillus isolates from north sea sediments. Int. J. Syst. Bact. 26, 427-441 (1976)

BONJOUR, F., ARAGNO, M.: Bacillus tusciae, a new species of thermoacidophilic facultatively chemolithoautotrophic, hydrogen oxidizing sporeformer from a geothermal area. Arch. Microbiol. 139, 397-401 (1984)

BOYD, W.L., BOYD, J.W.: Viability of thermophiles and coliform bacteria in arctic soils and water. Can. J. Microbiol. 8, 189-192 (1962)

BERKELEY, R.C.W., LOGAN, N.A., SHUTE, L.A., CAPEY, A.G.,: Identification of Bacillus species. In: Methods in Microbiology (Hrsg.: T. BERGAN) Academic Press, London (1984)

BRADLEY, S.G., MORDARSKI, M.: Association of polydeoxyribonucleotides of deoxyribonucleic acids from nocardioform bacteria. In: The Biology of the Nocardiae. (Hrsg.: M. GOODFELLOW, G.H. BROWNELL, J.A. SERRANO) Academic Press, London (1976)

BROCK, T.D.: Introduction: an overview of the thermophiles. In: Thermophiles: general, molecular, and applied aspects. (Hrsg.: T.D. Brock) John Wiley and Sons, New York. (1986)

CAMERON, E.J., ESTY, J.R.: The examination of spoiled canned foods. 2. Classification of flat sour spoilage organisms from non acid foods. J. Infect. Deseases 39, 89-105 (1926)

CERNY, G., HENNLICH, W., PORALLA, K.: Fruchtsaftverderb durch Bacillen: Isolierung und Charakterisierung des Verderbserregers, Z. Lebens. Unters. Forsch. 179, 224-227 (1984)

CLAUS, D., BERKELEY, R.C.W.: The genus Bacillus. In:Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Hrsg.: SNEATH, P.H.A., MAIR, W.S., SHARPE, M.E., HOLT, J.G.) Vol.2, 1st edition, Williams and Wilkins, Baltimore, (1986)

CLAUS, D., LACK, P., NEU, B.: DSM German Collection of Microorganisms: Bacteria, Filamentous Fungi, Yeasts. 3. Auflage, Gesellschaft für Biotechnologie mbH. (1983)

CLAUSEN, V., JONES, J.G., STACKEBRANDT, E.: 16S Ribosomal RNA analysis of Filibacter limicola indicates a close relationship to the genus Bacillus. J. Gen. Microbiol. 131, 2659-2663 (1985)

COLLINS, M.D.: Analysis of Isoprenoid Quinones. Methods in Microbiology. Vol. 18. (Hrsg.: G. GOTTSCHALK) Academic Press, London (1985)

COLLINS, M.D., JONES, D.: The distribution of isoprenoid quinones in streptococci of serological groups D and N. J. Gen. Microbiol. 114, 27-33 (1979a)

COLLINS, M.D., JONES, D.: The distribution of isoprenoid quinones in streptococci of serological group D. In: Pathogenic Streptococci. Proceedings of the 7th Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases (Hrsg.: M. T. PARKER) Reedbooks, Surrey, England (1979)

COLLINS, M.D., JONES,D.: Distribution of isoprenoid quinon structural types in bacteria and their taxonomic implications. Microbiol. Rev. 45, 316-354 (1981)

COLLINS, M.D., LANGWORTHY, T.A.: Respiratory quinone composition of some acidophilic bacteria. System. Appl. Microbiol. 4, 295-304 (1983)

COLLINS, M.D., SHAH, H.N., MINNIKIN, D.E.: A note on the separation of natural mixtures of bacterial menaquinones using reverse phase tin-layer chromatography. J. Appl. Bact. 48, 277-282 (1980)

DARLAND, G., BROCK, T.D.: Bacillus acidocaldarius sp. nov. an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. J. Gen. Microbiol. 67, 9-15 (1971)

DECKER, E.: Isolierung und Charakterisierung von Plasmiden aus thermoacidophilen Bacilli. Diplomarbeit Universität Tübingen (1987)

DEINHARD, G.: Taxonomische Untersuchungen an thermoacidophilen Bacilli. Diplomarbeit Universität Tübingen (1983)

DEINHARD, G., BLANZ, P., PORALLA, K., ALTAN, E.: Bacillus acidoterrestris sp. nov. a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. System. Appl. Microbiol. (1987a, in Druck)

DEINHARD, G., SAAR, J., KRISCHKE, W., PORALLA, K.: Bacillus cycloheptanicus sp. nov., a New Thermoacidophile Containing w-Cycloheptane Fatty Acids. System. Appl. Microbiol. (1987b, in Druck)

DE LEY, J.: Reexamination of the association between melting point, buoyant density, chemical base composition of deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 101, 738-754 (1970)

DE LEY, J., CATTOIR, H., REYNAERTS, A.: The quantitative measuremant of DNA hybridization rates. Eur. J. Biochem. 12, 133-142 (1970)

DE ROSA, M., GAMBACORTA, A., MINALE,L., BU'LOCK, J.D.: Cyclohexane fatty acids from a thermophilic bacterium. J. Chem. Soc. London, Chem. Commun. 1334 (1971a)

DE ROSA, M., GAMBACORTA, A., MINALE, L., BU'LOCK, J.D.: Bacterial triterpenes. Chemical Commun. 619-629 (1971b)

DE ROSA, M., GAMBACORTA, A., BU'LOCK, J.D.: An isolate of Bacillus acidocaldarius, an acidophilic thermophile with unusual lipids. Giorn. Microbiol. 19-20-21 (1971-1973)

DE ROSA, M., GAMBACORTA, A., MINALE, J., BU'LOCK, J.D.: Isoprenoids of Bacillus acidocaldarius. Phytochemistry 12, 1117-1123 (1973)

DE ROSA, M., GAMBACORTA, A., NICOLAUS, B., BU'LOCK, J.D.: Regularity of isoprenoid biosynthesis in the ether lipids of archaebacteria. Phytochemistry 19, 791-793 (1980)

DREHER, R., PORALLA, K., KÖNIG, W.A.: Synthesis of w-alicyclic fatty acids from cyclic precursors in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 127, 1136-1140 (1976)

DUNPHY, P.J., PHILLIPS, P.G., BRODIE, A.F.: Separation and identification of menaquinones from micro-organisms. J. Lipid Res. 12, 442-449 (1971)

FARRAND, S.G., LINTON, J.D., STEPHENSON, R.J., MACCARTHY, W.V.: The use of response surface analysis to study the growth of Bacillus acidocaldarius throughout the growth range of temperature and pH. Arch. Micrbiol. 135, 272-275 (1983)

FIELDS, M.L.: The flat sour bacteria. Adv. in Food Res. 18, 163-217 (1970)

FOX, G.E., PECHMANN, K.R., WOESE, C.R.: Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to procariotic systematics. Int. J. Syst. Bact. 27, 44-57 (1977)

FOX, G.E., STACKEBRANDT, E., HESPELL, R.B., GIBSON, J., MANILOFF, J., DYER, T.A., WOLFE, R.S., BALCH, E., TANNER, R.S., MAGRUM, L.J., ZABLEN, L.B., BLAKEMORE, R., GUPTA, R., BONEN, L., LEWIS, B.J., STAHL, D.A., LUEHRSEN, K.R., CHEN, K.N., WOESE, C.R.: The phylogeny of prokaryotes. Science 209, 457-463 (1980)

FURUYA, T., NAGUMO, T., ITOH, T., KANEKO, H.: The effect of growth temperature on the lipids in an extremely thermoacidophilic bacterium, TA-1. Agric. Biol. Chem. 44, 517-521 (1980)

GARCIA, J.L., ROUSSOS, S., BENSOUSSAN, M., BIANCHI, A., MANDEL, M.: Taxonomie numerique de Bacillus thermophiles isoles de sols de riziere de l'Afrique de l'ouest. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 133A, 471-488 (1982)

GIBSON, T., GORDON, R.E.: Bacillus COHN 1872. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8. Ausg. (Hrsg.: R.E. BUCHANAN, N.E. GIBBONS) The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1974)

GILLESPIE, T.G., THORPE, T.G.: Occurrence and significance of thermophiles in canned foods. J. Appl. Bact. 31, 59-65 (1968)

GOLOVACHEVA, R.S., LOGINOVA, L.G., SALIKHOV, T.A., KOLESNIKOV, A.A., ZAITSEVA, G.N.: A new thermophilic species Bacillus thermocatenulatus nov. sp. Microbiologya 44, 265-268 (1975)

GOODFELLOW, M.: Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. J. Gen. Microbiol. 69, 33-80 (1977)

GOODFELLOW, M., MINNIKIN, D.E.: Introduction to chemosystematics. In: Chemical Methods in Bacterial Systematics (Hrsg.: M. GOODFELLOW, D.E. MINNIKIN) Academic Press, London (1985)

GORDON, R.E.: Some taxonomic observations on the genus Bacillus. In: Biological regulation of vectors. (Hrsg.: J.D. BRIGGS) Washington D.C. US Department of Health, Education and Welfare (1977)

GORDON, R.E.: One hundred and seven years of the genus Bacillus. In: The aerobic endospore-forming bacteria.(Hrsg.: R.C.W. BERKELEY, M. GOODFELLOW) Academic Press, London (1981)

GORDON, R.E., HAYNES, W.C., PANG, C.H.N.:The Genus Bacillus. Handbook no. 427 Washington D.C. US Department of Agriculture (1973)

HEINEN, W.: Growth conditions and temperature dependent substrate specifity of two extremely thermophilic bacteria. Arch. Microbiol. 76, 2-17 (1971)

HEINEN, U.J., HEINEN, W.: Characteristics and properties of a caldoactive bacterium producing extracellular enzymes and two related strains. Arch. Mikrobiol. 82, 1-23 (1972)

HESS, A., HOLLANDER, R., MANNHEIM, W.: Lipoquinones of some spore-forming rods, lactic acid bacteria and actinomycetes. J. Gen. Microbiol. 115, 247-252 (1979)

HIPPCHEN, B., RÖLL, A., PORALLA, K.: Occurrence in soil of thermo-acidophilic Bacilli possessing ω-cyclohexane fatty acids and hopanoids. Arch. Microbiol. 1229, 53-55 (1981)

HOWLEY, P.M., ISRAEL, M.A., LAW, M.F., MARTIN, M.A.: Rapid method for detecting and mapping homology between heterologous DNAs - Evaluation of Polyomavirus genomes. J. Biol. Chem. 254, 4876-4883 (1979)

JOHNSON, J.L.: Systematics. Genetic Characterization. In: Manual of methods for general bacteriology.(Hrsg.: P. GERHARDT, R.G.E. MURRAY, R.N. COSTILOW, E.W. NESTER, W.A. WOOD, N.R. KRIEG, G.B. PHILLIPS) American Society for Microbiology, Washington DC (1981)

JONES, D., SACKIN, M.J.: Numerical Methods in the Classification and Identification of Bacteria with Especial Reference to the Enterobacteriaceae. In: Microbial Classification and Identification (Hrsg.: M. GOODFELLOW, R.G. BOARD) Academic Press, London, N.Y., Toronto, Sydney, S. Fanciscog (1980)

JONES, D., SNEATH, P.H.A.: Genetic transfer and bacterial taxonomy. Bacteriol. Rev. 34, 40-81 (1970)

KANEDA, T.: Biosynthesis of branched-chain fatty acids. IV. Factors affecting relative abundance of fatty acids produced by Bacillus subtilis. Can. J. Microbiol. 12, 501-514 (1966)

KANEDA, T.: Fatty acids of the genus Bacillus: an example of branched-chain preference. Bacteriol. Rev. 41, 391-418 (1977)

KANNENBERG, E., BLUME, A., PORALLA, K.: Properties of w-cyclohexane fatty acids in membranes. FEBS Lett. 172, 331-334 (1984)

KANNENBERG, E.,BLUME, A., GECKELER, K., PORALLA, K.: Properties of hopanoids and phosphatidylcholines containing ω-cyclohexane fatty acid in monolayer and liposome experiments. Biochim. Biophys. Acta 814,179-185 (1985)

KANNENBERG, E., BLUME, A., McELHANEY, R.N., PORALLA, K.: Mixed monolayer studies of the interactions of synthetic phosphatidylcholines containing branched fatty acids and a hopane glycolipid isolated from the thermo-acidophilic bacterium Bacillus acidocaldarius. Chem. Physics Lipids 39, 145-153 (1986)

KRISCHKE, W.: Die Isolierung und Charakterisierung pH- und temperatursensitiver Mutanten von Bacillus acidocaldarius. Diplomarbeit Universität Tübingen (1982)

KROPPENSTEDT, R.M.: Anwendung chromatographischer HP-Verfahren (HPTLC und HPLC) in der Bakterien-Taxonomie. GIT Lab. Med. 5, 266-273 (1982)

KRULWICH, L.F., DAVIDSON, J.F., STANLEY, A.S., ZUCKERMAN, R.S., GUFFANTI, A.A.: The protonmotive force and ß-galactoside transport in Bacillus acidocaldarius. The J. Biol. Chem. 253, 4599-4603 (1978)

LANGWORTHY, T.A., MAYBERRY, W.R.: 1,2,3,4-tetrahydroxypentane-substituted pentacyclic triterpene from Bacillus acidocaldarius. Biochim. Biophys. Acta 431, 570 (1976)

LANGWORTHY, T.A., MAYBERRY, W.R., SMITH, P.F.: A sulfonolipid and novel glucosamidyl glycolipids from the extreme thermoacidophile Bacillus acido-cal-darius. Biochim. Biophys. Acta 431, 550-569 (1976)

LANGWORTHY, T.A., POND, J.L.: Membranes and lipids of thermophiles. In: Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology. (Hrsg. T.D. BROCK) John Wiley and Sons, N.Y. (1986)

LOGAN, N.A., BERKELEY, R.C.W.: Classification and Identification of members of the Genus Bacillus using API tests. In: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. (Hrsg.: R.C.W. BERKELEY, M. GOODFELLOW) Academic Press, London (1981)

LOGAN, N.A., BERKELEY, R.C.W.: Identification of Bacillus strains using the API test-system. J. Gen. Microbiol. 130, 1871-1882 (1984)

LOGINOVA, L.G., KHRAPTSOVA, G.I., EGOROVA, L.A., BOGDANOVA, T.I.: Acidophilic, obligate thermophilic bacterium Bacillus acidocaldarius isolated from hot springs and soil of Kunashir island. Microbiology (Übersetzung von Microbiologyia, 47, 947-952) 771-775 (1978)

MARMUR, J.: A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J. Mol. Biol. 3, 208-218 (1961)

MARMUR, J., DOTY, P.: Heterogeneity in deoxyribonucleic acids. Dependence on composition of the configurational stability of deoxyribonucleic acids. Nature 183, 1427-1429 (1959)

MARMUR, J., DOTY, P.: Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. J. Mol. Biol. 5, 109-118 (1962)

MAYR, E.: Animal species and evolution. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge (Mass.) (1963)

MINNIKIN, D.E., GOODFELLOW, M.: Lipids in the classification of Bacillus and related taxa. In: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. (Hrsg.: R.C.W. BERKELEY, M. GOODFELLOW) Academic Press, London (1981)

PICHINOTY, F., GARCIA, J.-L., MANDEL, M.: Taxonomie numerique de 46 souches denitrifiantes et mesophiles de Bacillus isolees a partir du sol par cultur elective en presence de nitrite. Can. J. Microbiol. 26, 787-795 (1980)

NORRIS, J.R., BERKELEY, R.C.W., LOGAN, N.A., O'DONNEL, A.: The genera Bacillus and Sporolactobacillus. In: Prokaryotes, a Handbook of Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. (Hrsg.: M.P. STARR, H. STOLP, H.G. TRÜPER, A. BALOWS, H.G. SCHLEGEL) Springer N.Y. (1981)

OWEN, R.J., PITCHER, D.: Current methods for estimating DNA base composition and levels of DNA-DNA hybridization. In: Chemical Methods in Bacterial Systematics. (Hrsg.: GOODFELLOW, M., MINNIKIN, D.E.) Soc. Appl. Bact. (1985)

OSHIMA, T., ARAKAWA, H., BABA, M.: Biochemical Studies on an acidophilic, thermophilic bacterium Bacillus acidocaldarius: isolation of bacteria, intracellular pH, and stability of biopolymers. J. Biochem. 81, 1107-1113 (1977)

PORALLA, K., HäRTNER, T., KANNENBERG, E.:Effect of temperature and hopanoid content of Bacillus acidocaldarius. FEMS Microbiol.Lett. 23, 253-256 (1984).

PORALLA, K.,KANNENBERG, E., BLUME, A.: A glycolipid containing hopane isolated from the acidophilic thermophilic Bacillus acidocaldarius, has a cholesterol-like function in membranes.FEBS letters 113,1, 107-110 (1980)

PORALLA, K., KÖNIG, W.A.: The occurrence of ω-cycloheptane fatty acids in a thermo-acidophilic bacillus. FEMS Microbiol. Let. 16: 303-306 (1983)

PRIEST, F.G.: DNA homology in the genus Bacillus. In: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. (Hrsg.: R.C.W. BERKELEY, M. GOODFELLOW) Academic Press, London (1981)

PRIEST, F.G., GOODFELLOW, M., TODD, C.: The Genus Bacillus: a Numerical Analysis. In: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. (Hrsg.: R.C.W. BERKELEY, M. GOODFELLOW) Academic Press, London (1981)

SAAR, J.: Thermo-acidophile Bacilli mit w-Cycloheptanfettsäuren: Isolierung, Nährstoffbedürfnisse und Biosynthese ihrer Fettsäuren. Diplomarbeit Universität Tübingen (1985)

SCHENK, A., ARAGNO, M.: Bacillus schlegelii, a new species of thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic bacterium oxidizing molecular hydrogen. J. Gen. Microbiol. 46, 117-126 (1979)

SCHLEIFER, K.H., KANDLER, O.: Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol. Rev. 36, 407-477 (1972)

SCHOLZ, T., DEMHARTER, W., HENSEL, R., KANDLER, O.: Bacillus pallidus sp. nov., a new thermophilic species from sewage. System. Appl. Microbiol. 9, 91-96 (1987)

SEED, B.: Diazotizable arylamin cellulose papers for coupling and hybridization of nucleic acids. Nucleic acids Res. 10, 1799-1810 (1982)

SEKI, T., OSHIMA, T., OSHIMA, Y.: Taxonomic study of Bacillus by deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization and interspecific transformation. Int. J. Syst. Bact. 25, 258-270 (1975)

SEKI, T., CHUNG, C.K., MIKAMI, H., OSHIMA, Y.: Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of the genus Bacillus. Int. J. Syst. Bact. 25, 258-270 (1978)

SMITH, N.R., GORDON, R.E., CLARK, F.E.: Aerobic mesophilic sporeforming bacteria. Miscellaneous Publication No. 559. United States Department of Agriculture. Washington D.C. (1946)

SNEATH, P.H.A.: The Application of computers to taxonomy. J. Gen. Microbiol. 17, 201-226 (1957)

SNEATH, P.H.A., COLLINS, V.G.: A study in test reproducibility between laboratories: Report of a Pseudomonad Working Party . A.v. Leeuwenhoek J. Microbiol a. Serol. 40, 481-527 (1974)

SOKAL, R.R., MICHENER, C.D.: A statistical method for evaluating systematic relationships. Univ. Kansas Sci. Bull. 38, 1409-1438 (1958)

SOKAL, R.R., SNEATH, P.H.A.: Principles of Numerical Taxonomy. W.H. Freeman and Comp. S. Francisco London (1963)

STACKEBRANDT, E., LUDWIG, W., WEIZENEGGER, M., DORN, S., McGILL, T.J., FOX, G.E., WOESE, C.R., SCHLEIFER, H.K.: Comparative 16S rRNA oligonucleotide analysis and murein types of round-sporeforming bacilli and non-sporeforming relatives. J. Gen. Microbiol. (1987, im Druck)

STACKEBRANDT, E., WOESE, C.R.: The evolution of prokaryotes. In: Molecular and Cellular Aspects of Microbial Evolution. (Hrsg.: CARLILE, COLLINS, MOSELEY) Soc. General Microbiology Ltd. Sympos. 32. Cambridge University Press (1981)

STAHL, E.: Dünnschicht-Chromatographie. Ein Laborhandbuch. 2. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1967)

STANIER, R.Y., ADELBERG, E.A., INGRAHAM, J.L.: The Microbial World. Engelwood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall Inc. (1976)

STARK, G.R., WILLIAMS, J.G.: Quantitative analysis of specific labelled RNA's using DNA covalently bound to diazobenzyloxymethylpaper. Nucleic Acids Res. 6, 195-203 (1978)

STEINHAUSEN, D., LANGER, K.: Clusteranalyse, Einführung in Methoden und Verfahren der automatischen Klassifikation. DeGruyter, Berlin, N.Y. (1977)

STETTER, K.O.: Ultrathin mycelia-forming organisms from submarine volcanic areas having an optimum growth temperature of 105 °C. Nature 300, 258-260 (1982)

STETTER, K.O., KÖNIG, H., STACKEBRANDT, E.: Pyrodictium gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulphur reducing archaebacteria growing optimally at 105 °C. System. Appl. Microbiol. 4, 535-551 (1983)

UCHINO, F., FUKUDA, O.: Taxonomic characteristics of a thermophilic acidophilic strain of Bacillus producing thermophilic and acidophilic amylase and thermostable xylanase. Agric. Biol. Chem. 47, 965-967 (1983)

WALKER, P.D., WOLF, J.: Taxonomy of Bacillus stearothermophilus. In: Spore Research. (Hrsg.: A.N. BARKER, G.W. GOULD, J. WOLF. Academic Press, London, N.Y. (1971)

WOESE, C.R., FOX, G.E.: Phylogenetic structure of the prokariotic domain: the primary kingdoms. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 74, 5088-5090 (1977)

WOESE, C.R., WEISBURG, W.G., PASTER, B.J., HAHN, C.M., TANNER, R.S., KRIEG, N.R., KOOPS, H.-P., HARMS, H., STACKEBRANDT, E.: The phylogeny of purple bacteria - the beta subdivision. System. Appl. Microbio. 5, 327-336 (1984)

WOESE, C.R., STACKEBRANDT, E., MACKE, T.J., FOX, G.E.: A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. System. Appl. Microbiol. 6, 143-151 (1985)

WOESE, C.R., STACKEBRANDT, E., WEISBURG, W.G., PASTER, B.J., MADIGAN, M.T., FOWLER, V.J., HAHN, C.M., BLANZ, P., GUPTA, R., NEALSON, K.H., FOX, G.E.: The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. Syst. Appl. Microbiol. 5, 315-328 (1985)

WOESE, C.R., WEISBURG, W.G., HAHN, C.M., PASTER, B.J., ZABLEN, L.B., LEWIS, B.J., MACKE, T.J., LUDWIG, W., STACKEBRANDT, E.: The phylogeny of purple bacteria: the gamma subdivision. System. Appl. Microbiol. 6, 25-33 (1985)

WOLF, J., SHARP, R.J.: Taxonomic and related aspects of thermophiles within the Genus Bacillus. In: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria (Hrsg.: R.C.W. BERKELEY, M. GOODFELLOW) Soc. Gen. Microbiol. Academic Press (1981)

LEBENSLAUF

Gabriele Deinhard

02. 11. 1955 geboren in Gelsenkirchen

Eltern: Alfred Deinhard, Rentner, Brigitte Deinhard, geb. Suchhart, Hausfrau

Schulen:
Ostern 1962: Albrecht-Dürer-Schule, Bottrop
Ostern 1966: Neusprachliches Mädchengymnasium Bottrop
Juni 1966: Neusprachliches Mädchengymnasium Kempen, Niederrhein
Juni 1974: Abitur

Studium:
1974: Universität Karlsruhe (Chemie)
1975: Universität Konstanz (Biologie)
1976: Universität Tübingen (Biologie)

Prüfungen:
1977: Vordiplom (Zoologie, Botanik, Chemie, Physik)
1981: Diplomprüfung mit Hauptfach Mikrobiologie und Nebenfächern Zoophysiologie, Biochemie, Pharmakologie

Diplomarbeit: 1982-1983 unter Anleitung von Prof. Dr. K. Poralla, Biologie II, Mikrobiologie I, Universität Tübingen.
Titel: "Taxonomische Untersuchungen an thermoacidophilen Bacilli"

Dissertation: 1983-1987 am Institut Biologie II, Mikrobiologie I, Universität Tübingen bei Prof. Dr. K. Poralla

Meine akademischen Lehrer waren:

G. Adam, H.P.T. Ammon, R. Apfelbach, C.-F. Bardele, W. Bessler, P. Blanz, P. Böger, V. Braun, D. Bunke, H. Drautz, H. Erkert, H.-P. Fiedler, E. Fischer, K.G. Grell, J. Guglielmi, K.-G. Hantke, W. Harder, K. Heller, P. Hemmerich, U. Henning, J.-V. Höltje, G. Jung, R. Knippers, P. Krauss, E. Kulzer, P. Lange, P. Läuger, W. Loeffler, H. Markl, D. Mecke, G. Mickoleit, F.P. Möhres, W. Nakel, E. Nickel, F. Oberwinkler, P. Overath, D. Pette, W. Pfeiffer, K. Poralla, W. Rähle, A. Rieker, K. Schmidt-König, B. Schwemmle, H. Sund, G. Weitzel, R. Werner, G. Winkelmann, G. Wolff, H. Zähner,